

**Tierarzneimittel in Gülle**  
**- Entwicklung eines Methodenkatalogs für Labortests -**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Julia Heise  
aus Braunschweig

1. Referent:

apl. Professor Dr. Robert Kreuzig

2. Referent:

Professor Dr. Gerhard Flachowsky

eingereicht am:

10.09.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am:

22.11.2007

Druckjahr 2007

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

## **Publikationen**

Kreuzig, R., Heise, J., Hölte, S. (2006): DAS GÜLLE-PROJEKT – Ausarbeitung eines Methodenkataloges zur Untersuchung des Rückstandsverhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden. Mitt. Umweltchem. Ökotox. 12, 39-42.

## **Tagungsbeiträge**

Kreuzig, R., Heise, J., Hölte, S. (2005): Stability tests of veterinary medicinal products in liquid manures (Poster). Tagung der Kommission Bodenschutz "Bodenschutz ist Verbraucherschutz". Dessau, 5.12.2005.

Heise, J., Kreuzig, R. (2006): Stabilitätstests von Tierarzneimitteln in Gülle (Vortrag). Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie Halle, 04.10. – 06.10.2006.

Hölte, S., Heise, J., Batarseh, M., Stein, F., Klein-Goedicke, J., Kreuzig, R. (2006): The manure project: Laboratory testing on VMP in manure and manured soils (Poster). Symposium Untersuchung der Notwendigkeit eines Altstoffprogramms für Tierarzneimittel, Umweltbundesamt, Berlin, 12.12.-13.12.2006.

Heise, J. (2006): Tierarzneimittel in Gülle: Entwicklung eines Methodenkataloges mit Richtliniencharakter (Vortrag). Kolloquium des GDCh-Ortsverbands Braunschweig, 18.12.2006.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2004 bis Oktober 2006 im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik der Technischen Universität Braunschweig unter der Leitung von Herrn apl. Prof. Dr. R. Kreuzig im Rahmen des Forschungsprojektes „Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden: Die Erarbeitung eines Methodenkataloges für Labortests“ (UBA-FKZ 204 67 455) angefertigt. Für die finanzielle Förderung danke ich dem Umweltbundesamt als Projektträger.

Herrn apl. Prof. Dr. R. Kreuzig möchte ich für die aktuelle und interessante Themenstellung und die engagierte und fachkundige Betreuung dieser Arbeit danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Flachowsky für die Übernahme des Korreferats sowie Herrn Dr. A. Berk und Herrn Dr. U. Meyer vom Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig für die fachkundige Unterstützung und die Bereitstellung der Exkrementproben.

Für die Bereitstellung des Laboratoriums und der umfassenden Infrastruktur möchte ich mich beim Institutsleiter Herrn Prof. Dr. mult. Dr. h. c. M. Bahadir herzlich bedanken.

Des weiteren danke ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Ökologische Chemie und Abfallanalytik für die Zusammenarbeit und ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Besonderer Dank gilt hier Frau Dr. S. Höltge, Frau Dipl. Chem. I. Schmanteck, Frau I. Ahlfeld und nicht zuletzt den zahlreichen Auszubildenden zum Chemielaboranten, die mir im Rahmen ihrer Stationsausbildung eine große Hilfe waren.

Einen ganz besonderen Dank gilt Udo Meyer für seine fast schon unendliche Geduld und Unterstützung sowie dafür, dass er nie am Gelingen dieser Arbeit zweifelte, sowie meinen Freunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn ich sie brauchte.

Schlussendlich gilt mein aufrichtiger Dank meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mich durch alle Höhen und Tiefen in allen Belangen vorbehaltlos unterstützt haben.

Meinem Vater

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Eintrag von Tierarzneimitteln in die Umwelt	1
1.2	Einsatz von Gülle als Testmatrix	6
1.3	Stand der Forschung	8
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
3.1	Eingesetzte Exkremente und Gülle	16
3.1.1	Auswahl der verwendeten Exkremente	16
3.1.2	Bestimmungsmethoden der Parameter zur Matrixcharakterisierung	18
3.1.3	Konditionierung und Lagerung der Exkremente	29
3.1.4	Herstellung von Referenzgülle	29
3.1.5	Interner Ringversuch zur Matrixcharakterisierung von Exkrement- und Gülleproben	30
3.2	Auswahl der eingesetzten Sulfonamide	31
3.2.1	Pharmakologie der Sulfonamide	31
3.2.2	Eingesetzte Radiotracer	32
3.2.3	Bestimmung der radiochemischen Reinheit	34
3.2.4	Unmarkierte Testsubstanzen	34
3.3	Durchführung der Stabilitätstests	35
3.3.1	Batch-Apparatur	35
3.3.2	Durchfluss-Apparatur	37
3.3.3	Matrixcharakterisierungstests	38
3.4	Bestimmung der Mineralisation	38
3.4.1	Erfassung weiterer flüchtiger Bestandteile	40
3.4.2	Vorversuch zur Freisetzung von <sup>14</sup> C-Kohlendioxid	41
3.5	Extraktion von Sulfonamiden aus Gülle	42
3.5.1	Überprüfung von Ethylacetat als Lösungsmittel	42
3.5.2	Bestimmung der extrahierbaren Rückstände	42
3.5.3	Metaboliten-Screening	43
3.6	Bestimmung der nicht-extrahierbaren Rückstände	44

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Eingesetzte Exkremente und Referenzgülleproben</b>	<b>46</b>
4.1.1	Konditionierung der Exkremente	46
4.1.2	Effekte der Exkrementlagerung bei –20 °C	50
4.1.3	Vergleich der Exkrement- und Referenzgüllematrizes	52
<b>4.2</b>	<b>Qualitätssicherung zur Matrixcharakterisierung</b>	<b>56</b>
<b>4.3</b>	<b>Voruntersuchungen für die Stabilitätstests</b>	<b>60</b>
4.3.1	Bestimmung von <sup>14</sup> C-Kohlendioxid	61
4.3.2	Eignung verschiedener Extraktionsmittel für Gülleproben	62
4.3.3	Vergleich von Batch-Apparatur und Durchfluss-Apparatur	64
<b>4.4</b>	<b>Stabilität von Sulfamethoxazol in Gülle</b>	<b>66</b>
4.4.1	Rückstandsdynamik von <sup>14</sup> C-Sulfamethoxazol in Rindergülle	66
4.4.2	Rückstandsdynamik von <sup>14</sup> C-Sulfamethoxazol in Schweinegülle	73
4.4.3	Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen	79
4.4.4	Einfluss verschiedener Trockensubstanzgehalte	81
4.4.5	Einfluss verschiedener Güllematrizes	83
<b>4.5</b>	<b>Stabilität von Acetyl-Sulfamethoxazol in Gülle</b>	<b>86</b>
4.5.1	Rückstandsdynamik von <sup>14</sup> C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle	86
4.5.2	Rückstandsdynamik von <sup>14</sup> C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Schweinegülle	90
<b>4.6</b>	<b>Stabilität von Sulfadiazin in Gülle</b>	<b>92</b>
4.6.1	Rückstandsdynamik von <sup>14</sup> C-Sulfadiazin in Rindergülle	92
4.6.2	Rückstandsdynamik von <sup>14</sup> C-Sulfadiazin in Schweinegülle	95
<b>4.7</b>	<b>Bewertung des Methodenkatalogs</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>108</b>
<b>ANHANG</b>		

## Abkürzungsverzeichnis

A-SMZ	Acetyl-Sulfamethoxazol
ATV-DVWK	Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.
BBA	Biologische Bundesanstalt
BfT	Bundesverbandes für Tiergesundheit
BHZZP	Bundeshybridzuchtprogramm
BLAC	Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit
Bq	Bequerel
BSB <sub>5</sub>	Biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
C	Kohlenstoff
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitril
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
Cu	Kupfer
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DIN	Deutsche Industrienorm
DT <sub>50</sub>	Abnahmezeit für 50 % des applizierten Wirkstoffs
DT <sub>90</sub>	Abnahmezeit für 90 % des applizierten Wirkstoffs
Eh	Redox-Potential
EMA	European Medicines Agency
EN	Europa Norm
ER	extrahierbare Rückstände
ERAPharm	Environmental risk assessment of pharmaceuticals
ERAVMIS	Environmental risk assessment of veterinary medicines in slurry
EtAc	Ethylacetat
EU	Europäische Union
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FEDESA	European Federation of Animal Health Industry
FG	Frischgewicht
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP-OES	Optische Emissionsspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma
IFAH	Internationale Federation for Animal Health
IR	Infrarot
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung



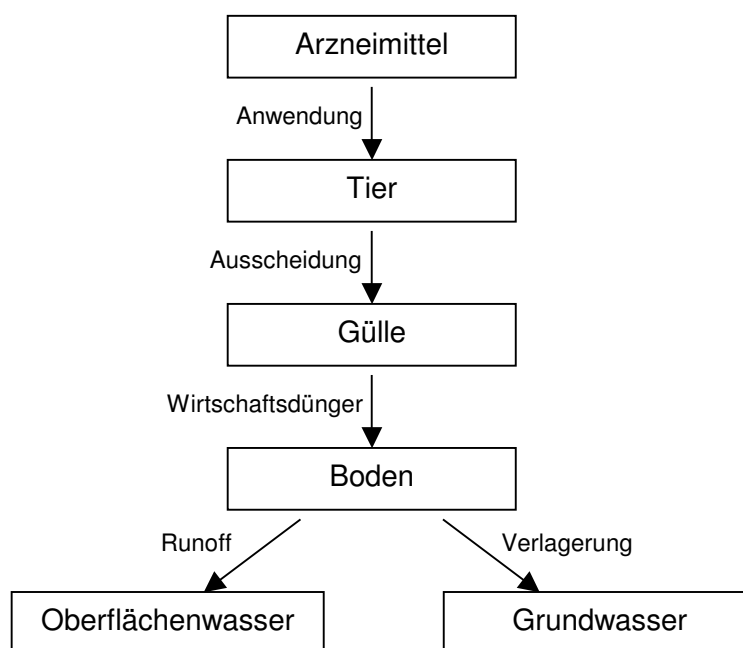
KTBL	Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft
LSC	β-Liquid Scintillation Counter
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
MIN	Mineralisation
n	Anzahl der Messungen
n.b.	nicht bestimmbar
n.d.	nicht detektiert
n.u.	nicht untersucht
NER	nicht-extrahierbare Rückstände
NH <sub>4</sub> -N	Ammonium-Stickstoff
N <sub>total</sub>	Gesamt-Stickstoff
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
P	Phosphor
PEC	Predicted Environmental Concentration
r <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RE	Rinderexkrement
R <sub>f</sub> -Wert	Retentionsfaktor
RG	Rindergülle
R <sub>min</sub>	Mineralischer Gehalt
RIVM	Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu
RTLC	Radio Thin Layer Chromatography
SD	Standard Deviation
SDZ	Sulfadiazin
SE	Schweineexkrement
SG	Schweinegülle
SMZ	Sulfamethoxazol
SOP	Standardarbeitsanweisungen
Std	Standard
TOC	organischer Gesamt-Kohlenstoff
TS	Trockensubstanz
TU	Technische Universität
UBA	Umweltbundesamt
VC	Variationskoeffizient
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products
WFR	Wiederfindungsrate

# 1 Einleitung

## 1.1 Eintrag von Tierarzneimitteln in die Umwelt

Tierarzneimittel werden in der landwirtschaftlichen Praxis zur Behandlung und Prävention von Krankheiten, aber auch als Leistungsförderer in Nutztierbeständen eingesetzt (Kay et al., 2004; McEwen und Fedorka-Gray, 2002; Sattelberger et al., 2005). Nach der Behandlung eines Tierbestandes können die therapeutisch aktiven Ausgangsverbindungen und deren im tierischen Organismus gebildeten Metaboliten wieder ausgeschieden werden und gelangen so in die Gülle. In diversen Studien ließen sich 46 bis 98 % der eingesetzten Tierarzneimittel in tierischen Exkrementen nachweisen (Berger et al., 1986; DeLiguoro et al., 2003; Wang et al., 2006; Langhammer et al., 1988; Haller et al., 2002). Der Einsatz der Gülle als Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftlichen Flächen stellt somit den wesentlichen Eintragspfad von Tierarzneimittel in die Umwelt dar.

Die mit der Gülle auf den Boden aufgebrauchten Substanzen bzw. deren Metaboliten können sich je nach Abbauverhalten in den obersten Bodenschichten anreichern (BLAC, 2003; Halling-Sørensen, 2001; Hamscher et al., 2002; Höper et al., 2002; Kreuzig und Höltge, 2005; Sattelberger et al., 2005). Über Verlagerung und Abschwemmung (Runoff) besteht die Möglichkeit, dass die Substanzen ins Grundwasser bzw. in Oberflächengewässer gelangen (Boxall et al., 2003; Halling-Sørensen et al., 1998; Kreuzig et al., 2007; Sarmah et al., 2006) (**Abb. 1**).



**Abb. 1: Eintragspfad von Tierarzneimittel in die Umwelt**

Über die Verbrauchsmenge bzw. den Umwelteintrag von Tierarzneimitteln liegen weder für die Europäische Union (EU) noch für Deutschland konkrete Zahlen vor (Winkler et al., 2004). Die Abgabe von Tierarzneimitteln muss zwar von den Tierärzten protokolliert werden, jedoch werden diese Zahlen nicht zentral erfasst und ausgewertet. Nach Koschorreck et al. (2002) werden in Deutschland etwa 2700 verschiedene Tierarzneimittel verwendet, welche auf 600 Wirkstoffe zurückgehen. Der Großteil der Substanzen entfällt laut des Bundesverbandes für Tiergesundheit (BfT) mit steigender Tendenz auf die Klasse der Antibiotika mit einem Anteil von 31 % am Gesamtumsatz von Tierarzneimitteln in Deutschland. So war für das Jahr 2005 eine Umsatzsteigerung von 8.8 % am gesamten Tierarzneimittelmarkt gegenüber 2004 zu verzeichnen (BfT, 2006).

Schneidereit (2005) gab nach einer Erhebung der Arzneimittelabgaben durch Veterinärmediziner eine Gesamtabgabemenge von 670 Tonnen Antibiotika für das Jahr 2003 in Deutschland an. Das Umweltbundesamt kam hingegen für das Jahr 2000 nach einer Berechnung der Abgabemenge von Tiermedizineren auf einen Gesamtverbrauch von 2126 Tonnen Antibiotika pro Jahr (Klein-Goedicke, 2005). Die wichtigsten in der Nutztierhaltung eingesetzten Antibiotika-Wirkstoffgruppen in Deutschland waren nach einer Untersuchung von Winckler und Grafe (2001) die Tetracycline mit 52 %, Sulfonamide mit 19 %, Aminoglykoside mit 9 % und die  $\beta$ -Lactame mit 5 %. Neben den Antibiotika nimmt die Wirkstoffklasse der Antiparasitika mit einer Abgabemenge von 31 Tonnen jährlich einen weiteren großen Anteil mit 17 % des Tierarzneimittelmarktes in Deutschland ein (BfT, 2006; Schneidereit, 2005).

Für den EU-weiten Einsatz von Tierarzneimitteln liegen Schätzungen der European Federation of Animal Health Industry (FEDESA) für das Jahr 1999 vor. Demnach wurden 35 % aller abgegebenen Antibiotika in der Veterinärmedizin mit einem Anteil von 4700 Tonnen eingesetzt. Hiervon entfielen 790 Tonnen auf Wachstumsförderer (FEDESA, 2001). Im Januar 2003 wurde die FEDESA in den Weltverband der IFAH (Internationalen Federation for Animal Health) integriert. Laut IFAH betrug der Anteil der Antiinfektiva 16 %, der Antiparasitika 29 % am weltweiten Tierarzneimittelverbrauch (IFAH, 2005).

Die Umweltrelevanz von Tierarzneimitteln zeigt sich in Screening-Untersuchungen, durch welche sich zahlreiche Antibiotika in Gülle nachweisen ließen (**Tab. 1**). Je nach Wirkstoff und Güllematrix kann die enthaltene Konzentration deutlich oberhalb  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  liegen. Der Gehalt an Tierarzneimitteln in der Gülle ist von Faktoren wie der Dosierung, der Stoffgruppe, der Art der Verabreichung, dem Grad der Metabolisierung im Organismus der jeweiligen Tierart und den Abbauvorgängen nach der Ausscheidung abhängig (Halling-Sørensen et al., 2001; Sarmah et al., 2006). Je nach Stoffgruppe und in Abhängigkeit vom tierischen Metabolismus können unterschiedliche Anteile der

verabreichten Wirkstoffe über den Kot oder den Harn ausgeschieden werden. Eine differenzierte Betrachtung von Kot und Harn ist jedoch nicht erforderlich, da die Ausscheidungen in der landwirtschaftlichen Praxis immer als Gemisch vorliegen (KTBL, 2005).

**Tab. 1: Konzentrationen von Tierarzneimitteln in Gülle**

Gülle	Substanz	Konzentration [mg kg <sup>-1</sup> ]*	Referenz
<b>Sulfonamide</b>			
Rind	Sulfadiazin	1.1	Höper et al., 2002
Rind	Sulfamethazin	0.05 - 38	Haller et al., 2002; Harms, 2006
Schwein	Sulfadiazin	0.1-35.3	Hamscher et al., 2005; Harms, 2006; Höper et al., 2003; Höper et al., 2002; Winkler et al., 2004
Schwein	Sulfadimidin (= Sulfamethazin)	0.8-2.9	Christian et al., 2003; Sattelberger et al., 2005
Schwein	Acetyl-Sulfamethazin	0.05-27	Haller et al., 2002; Harms, 2006
Schwein	Sulfamethoxazol	0.01-0.05	Harms, 2006; Sattelberger et al., 2005
Schwein	Sulfathiazol	0.05-12.4	Haller et al., 2002; Harms, 2006
<b>Tetracycline</b>			
Rind	Oxytetracyclin	19-2.1	DeLiguoro et al., 2003
Rind	Tetracyclin	0.1-46.0	Harms, 2006; Höper et al., 2002
Schwein	Tetracyclin	0.01-66	Höper et al., 2002 ; Höper et al., 2003; Hamscher et al., 2005; Sattelberger et al., 2005; Campagnolo et al., 2002
Schwein	Chlortetracyclin	0.05-50.8	Harms, 2006; Sattelberger et al., 2005
Schwein	Oxytetracyclin	0.03-1.09	Harms, 2006; Sattelberger et al., 2005
<b>Makrolid</b>			
Rind	Tylosin	< 0.1	DeLiguoro et al., 2003

alle Angaben bezogen auf Frischgewicht; \* entspricht mg L<sup>-1</sup>

### Wirkung von Tierarzneimitteln in der Umwelt

Der Eintrag von Tierarzneimitteln kann aufgrund der gewünschten biologischen Wirkung der Substanzen adverse Effekte für die belebte Umwelt bergen (Halling-Sørensen et al., 1998). So reagieren vor allem Mikroorganismen auf den Einsatz von Antibiotika (Al-Ahmad et al., 1999; Halling-Sørensen et al., 2002; Pfeiffer et al., 1998; Schmitt, 2005;

Thiele-Bruhn und Beck, 2005; Thiele und Beck, 2001). Neben der direkten Wirkung von Antibiotika besteht auch die Möglichkeit der Resistenzbildung (Hölzel, 2006; Kumar et al., 2005a) sowie dem Eintrag resistenter Keime in die Umwelt. Zudem können Antibiotika in Gülle zu Störungen beim Betrieb von Fermentern und Biogasanlagen führen (Lallai et al., 2002).

Die tatsächlichen Wirkungen von Tierarzneimitteln in der Umwelt lassen sich aufgrund der begrenzten Anzahl verfügbarer Studien zu diesem Zeitpunkt nicht abschätzen (Hamscher et al., 2005; Kay et al., 2004). Zudem existieren keine einheitlichen Untersuchungsverfahren, was eine Vergleichbarkeit einzelner Studien unmöglich macht (Boxall et al., 2003; Sattelberger et al., 2005; Thiele-Bruhn, 2003). Die akute und subakute Toxizität von Antibiotika auf die Makro- und Mesofauna des Bodens (z.B. Regenwürmer, Enchytraea, Springschwänze) ist nach den vorliegenden Untersuchungen aufgrund der nachgewiesenen Umweltkonzentrationen jedoch als niedrig einzustufen (Baguer et al., 2000; Höper et al., 2002; Thiele-Bruhn, 2003). Für aquatische Organismen konnten Wollenberger et al. (2000) einen Effekt auf die Reproduzierbarkeit von *Daphnia magna* durch Oxytetracyclin, Sulfadiazin, Tetracyclin und Tiamulin nachweisen. Auch für *Artemia* sind toxische Effekte verschiedener Antibiotika nachgewiesen (Migliore et al., 1997).

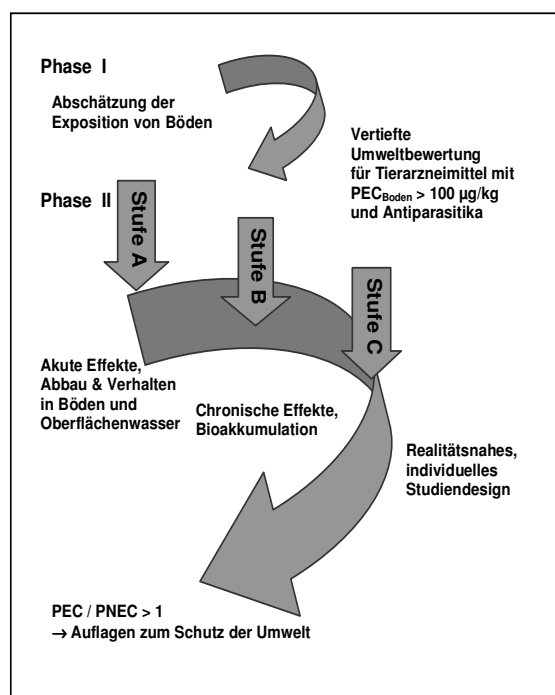
Eine Aufnahme von Antibiotika aus Gülle durch Nutzpflanzen, in diesem Fall Winterweizen und Feldsalat, konnte durch Grote (2005) nachgewiesen werden. Langhammer et al. (1988) stellten einen Gehalt von 3-15 % des Sulfonamides Sulfadimidin in den Wurzeln von Mais fest. Auch Boxall et al. (2006) konnten die Aufnahme verschiedener Tierarzneimittel in Karotten und Kopfsalat aufzeigen.

### **Umweltbewertung von Tierarzneimitteln**

Der mögliche Eintragspfad von Tierarzneimitteln in den Boden findet im mehrstufigen Prüfkonzep der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) im Rahmen der International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products (VICH) Berücksichtigung (EMA, 1998; VICH, 2000; 2003). Dieses Prüfkonzep findet für alle seit 1998 auf den Markt gebrachten Tierarzneimittel EU-weit Anwendung. Die vorher zugelassenen, sogenannten Altarzneimittel, werden jedoch nicht in die Risikoabschätzung einbezogen (Hamscher et al., 2002; Höper et al., 2002; Montforts et al., 1999; Tolls, 2001; Winckler und Grafe, 2001).

In Phase 1 des Prüfkonzeps wird ein Expositionsszenario erstellt, in welchem die zu erwartende Konzentration der Substanz im Boden (predicted environmental concentration, PEC) Berücksichtigung findet (Spaepen et al., 1997). Die Berechnung erfolgt auf Grundlage der eingesetzten Menge des Wirkstoffs und dessen Eintragssituation in die

Gülle und mit der Gülle in den Boden. Ist durch die Ausbringung von Gülle die Überschreitung eines Triggerwertes von  $100 \mu\text{g Wirkstoff kg}^{-1}$  Boden zu erwarten (Rönnefahrt et al., 2002), verlangen sowohl VICH als auch die EMEA für die Neuzulassung eines Tierarzneimittels zusätzliche Untersuchungen zum Verhalten der Substanz in der Umwelt. Damit geht die Substanz in Phase 2 der Risikoabschätzung ein (**Abb. 2**). Diese, für Antiparasitika zwingend vorgeschriebenen Studien, beinhalten neben Tests zur ökotoxikologischen Wirkung der Substanzen unter anderem auf die Dungfauna, Regenwürmer und Daphnien, auch Tests zum Rückstandsverhalten der Substanzen in Böden. Hierbei werden in Anlehnung an OECD-Richtlinien zur Untersuchung von Chemikalien (OECD 2000; 2002) Abbauraten ( $DT_{50}$ ,  $DT_{90}$ ) und Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ -,  $K_{oc}$ -Werte) in Labortests ermittelt. In diesen Tests werden die zu untersuchenden Tierarzneimittel vorzugsweise als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer in einem geeigneten Lösungsmittel direkt zu den Bodenproben dotiert. Damit bleibt in Phase 2 des Prüfkonzpts der eigentliche Eintragspfad von Tierarzneimitteln über die Gülle in den Boden sowie die Sorption und Desorption als konzentrationsbestimmende Prozesse während der Güllelage unberücksichtigt. Die größte Schwierigkeit der Durchführung von Tests unter Berücksichtigung der Gülle stellt hierbei die repräsentative Entnahme von Gülleproben mit einer reproduzierbaren Zusammensetzung aus Güllesilos bzw. -tanks dar.



**Abb. 2:** Leitfaden für die Umweltbewertung von Veterinärpharmaka (Rönnefahrt et al., 2002)

## 1.2 Einsatz von Gülle als Testmatrix

Gülle ist eine komplexe, heterogene und variable Matrix, welche aus dem Kot und Harn von Nutztieren besteht. Gülle kann neben den tierischen Exkrementen zusätzlich weitere Bestandteile enthalten, welche aus dem Stall ausgetragen werden. Hierzu zählt in erster Linie Wasser, welches bei der Stallreinigung oder aus den Tränken in die Gülle eingetragen wird, aber auch andere natürliche Stoffe wie Stroh, Futterreste, Haare, Horn, Sand oder Steine. Zusätzlich können neben ausgeschiedenen Arzneimitteln auch Substanzen wie Reinigungs- und Desinfektionsmittel in die Gülle gelangen. Die Zusammensetzung der Exkremente, und somit auch der Gülle, hängt zudem von der Tierart, der Rasse, dem Alter der Tiere sowie den Fütterungs- und Haltungsbedingungen ab (Hahne, 2001; Hoffmann und Hege, 1991; Montforts und Tarazona Lafarga, 2003; Schuchardt und Hahne, 1996; Tietjen et al., 1977; Zhang und Westerman, 1997).

**Tab. 2: Zusammensetzung von Rindergülle**

<b>Untersuchungs- gebiet / Autoren</b>	<b>TS [%]</b>	<b>P [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>pH</b>	<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>
<b>Deutschland /</b> Buning, 1997	7.0	---	50	7.7	1.7	3.2	---	---
<b>Deutschland /</b> Merkel, 2005	0.4- 12.3	0.05- 2.7	---	---	0.01- 2.9	0.4- 5.7	---	---
<b>Deutschland /</b> Schuchardt und Hahne, 1996	3	1.5	---	---	1.7	3	12-21	68-82
	8	2	---	---	2.2	4	16-27	90- 109
	10	2.5	---	---	2.8	5	20-34	113- 136
<b>Dänemark /</b> Nielsen et al., 2004	5.7 ± 0.2	---	---	7.3	1.5	2.5	---	---
	5.5 ± 0.1	---	---	7.2	1.3	2.1	---	---
<b>Niederlande /</b> Bouwman und Reus, 1994	9.6 ± 2.1	2.0 ± 0.7	68 ± 15	8.2 ± 0.2	---	4.9 ± 0.8	---	---
<b>EU /</b> Burton et al., 2003	1.5- 12.3	0.2- 6.6	10-75	---	1.0- 4.9	2.0- 7.0	---	---

--- : nicht angegeben, alle Angaben bezogen auf Frischgewicht

Weitere Faktoren für die Variabilität von Gülle stellen die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen und -zeiten dar. So kann Gülle direkt unter dem Stall, in unterirdischen Tanks oder in offenen oder geschlossenen oberirdischen Silos mit einem Fassungsvermögen

von bis zu 10 000 m<sup>3</sup> gelagert werden (Burton et al., 2003; Hüther, 1999). Nach Burton et al. (2003) variieren die Lagerungszeiten europaweit zwischen 2 bis 12 Monaten, je nach Jahreszeit, Witterungslage und Lagerungskapazität. In Deutschland wird durch die Düngeverordnung (2006) eine Lagerkapazität von mindestens 6 Monaten vorgeschrieben. Während dieser Lagerung unterliegen die organischen Bestandteile und die eingetragenen Fremdstoffe Ab- und Umbauprozessen (Winkler et al., 2004).

**Tab. 3: Zusammensetzung von Schweinegülle**

<b>Untersuchungs- gebiet / Autoren</b>	<b>TS [%]</b>	<b>P [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>pH</b>	<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>
<b>Deutschland</b> / Buning, 1997	5.1	---	37	8.1	5.3	6.5	---	---
<b>Deutschland</b> / Hahne, 2001	1.4 - 10.6	---	9.5- 77.3	---	1.9- 7.7	2.5- 9.9	8.5- 48.6	18- 117
<b>Deutschland</b> / Merkel, 2005	0.4- 11.6	0.03- 6.3	---	---	0.3- 4.9	0.6- 8.3	---	---
<b>Deutschland</b> / Schuchhardt und Hahne, 1996	3	1.7	---	---	1.8	2.6	9-23	35-49
	6	1.3	---	---	3.6	5.1	18-46	70-97
	9	5	---	---	5.4	7.7	27-69	106- 145
<b>Niederlande</b> / Bouwman und Reus, 1994	7.4 ± 2.5	3.9 ± 1.5	49 ± 19	8.0 ± 0.2	---	6.5 ± 1.4	---	10-15
<b>Spanien</b> / Moral et al., 2005	2.3 ± 3.1	---	---	7.4 ± 0.3	2.0 ± 1.1	2.6 ± 1.3	14 ± 9	32 ± 21
<b>EU</b> / Burton et al., 2003	1.5- 9.2	---	5- 64	---	---	1.2- 8.2	---	---
<b>USA</b> / Ndegwa et al., 2003	2.9 ± 0.7	---	---	7.7 ± 0.0	1.5 ± 0.1	4.1 ± 0.1	7.9 ± 0.2	---

--- : nicht angegeben, alle Angaben bezogen auf Frischgewicht

Somit schwankt die Zusammensetzung von Gülle erheblich, wobei zudem konkrete und vergleichbare Angaben in der Regel fehlen, da kein einheitliches Charakterisierungssystem für Gülle existiert (Burton et al., 2003). Diese Variabilität spiegelt sich in den in **Tab. 2** und **Tab. 3** zusammengefassten Literaturangaben für die Zusammensetzung von Rinder- und Schweinegülle wider. Beispielhaft seien hier Trockensubstanzgehalte mit einer Schwankungsbreite von 0.4 bis 12.3 % für Rinder- und 0.4 bis 11.6 % für Schweinegülle sowie der Gesamt-Stickstoff-Gehalt mit 0.4 bis 7.0 g kg<sup>-1</sup> bzw. 0.6 bis 9.9 g kg<sup>-1</sup> in Rinder- bzw. Schweinegülle genannt. Aufgrund der dargestellten extremen Variabilität von Gülle



kann eine Probennahme aus Güllesilos oder –tanks, wie sie in der landwirtschaftlichen Praxis genutzt werden, nicht zu einer Gülle mit reproduzierbarer Zusammensetzung führen.

### **1.3 Stand der Forschung**

Da Tierarzneimittel nicht direkt, sondern immer in Verbindung mit Gülle in die Umwelt gelangen, kann und darf dieser Eintragspfad nicht unberücksichtigt bleiben (Sukul und Spiteller, 2006). Aus diesem Grund wurden und werden Untersuchungen zum Vorkommen und Verhalten von Tierarzneimitteln in den Umweltkompartimenten Oberflächenwasser (Christian et al., 2003; Hamscher et al., 2002), Grundwasser (Hamscher et al., 2001; Höper et al., 2003) und Boden (Hamscher et al., 2005; Höper et al., 2003; Kay et al., 2004; Kreuzig und Höltge, 2005; Kreuzig et al., 2007; Sattelberger et al., 2005; Tolls et al., 2001; Wang et al., 2006) durchgeführt. Zudem wird auch die Aufnahme von Tierarzneimitteln in Pflanzen und tierische Organismen bzw. ihre ökotoxikologische Wirkung untersucht (Boxall et al., 2006; Fernández et al., 2004; Kumar et al., 2005b; Wollenberger et al., 2000).

Die Untersuchungen von Tierarzneimitteln in der Gülle selbst unterliegen jedoch einer hohen Variabilität u.a. im Bezug auf das Alter, die Zusammensetzung und die physikalisch-chemischen Parameter (z.B. pH-Wert, Redox-Potential) der Gülle, der Lagerungszeit und den Eigenschaften der Testsubstanzen sowie den Untersuchungs- und Analysemethoden. So gibt es Untersuchungen zum Verhalten von Tierarzneimitteln nach direkter Zugabe der Substanzen zu Gülleproben. Andere Autoren untersuchten das Verhalten von Tierarzneimitteln in Gülle nachdem die Substanzen einem Tier verabreicht und wieder ausgeschieden wurden. Damit wird ein Vergleich der bisher wenigen Untersuchungen oft schwierig bis unmöglich und führt häufig zu widersprüchlichen Aussagen (Winkler et al., 2004).

Der Abbau von Tierarzneimitteln in der Umwelt wird häufig mittels der Halbwertszeit ( $DT_{50}$ -Wert) der Substanzen, welche anhand des Anteils der extrahierbaren Rückstände ermittelt wird, angegeben. Dieser Wert ist jedoch nicht unkritisch zu betrachten. Zum einen hängt der Anteil der extrahierbaren Rückstände von der verwendeten Extraktionsmethode ab, zum anderen gehen einige Autoren davon aus, dass eine Substanz, die nicht mehr extrahierbar ist, nicht vollständig aus der Umwelt eliminiert sein muss. Nach van Vlaardingen et al. (2001) wird die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände als Abbau bezeichnet, unter der Annahme, dass die Rückstände nach der Gölledüngung nicht mehr

biologisch aktiv sind. Auch Schluesener et al. (2006) geben für die Eliminierung von Tierarzneimitteln aus Gülle, neben dem vollständigen Abbau und einer Metabolisierung, die Festlegung der Substanzen in der Güllematrix an. Chander et al. (2005) stellten jedoch fest, dass im Boden gebundene Antibiotika-Rückstände einen Einfluss auf terrestrische Mikroorganismen haben können. Höltge (2005) und Heise et al. (2006) konnten eine Freisetzung der pharmazeutisch aktiven Ausgangssubstanz nach salzsaurer Nachextraktion bzw. Silylierung nicht-extrahierbarer Sulfonamidrückstände aus güllegedüngten Böden aufzeigen. Nach Schäffer et al. (2002) kann die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände, neben der biochemischen Umsetzung, auch aus der Verwertung der Substanzen im Baustoffwechsel der Mikroorganismen resultieren. In diesem Fall könnte die markierte Substanz erst nach vollständiger Zerstörung der Zellen erfasst werden. Weber (1996) gibt an, dass durch den Einsatz saurer, basischer und enzymatischer Extraktionsmittel auch proteingebundene Rückstände extrahiert werden können.

Kühne et al. (2000) untersuchten den Abbau von Tetracyclin in 1 L Schweinegülle in geschlossenen Testsystemen bei Raumtemperatur. Es konnten  $DT_{50}$ -Werte von 19 Tagen unter anaeroben Bedingungen bestimmt werden. Ein deutlich anderes Rückstandsverhalten zeigte Tetracyclin in Schweinegülle in einer im Auftrag des Umweltbundesamtes durchgeführten Untersuchung unter möglichst ähnlichen Bedingungen wie in der landwirtschaftlichen Praxis (Winkler und Grafe, 2000). Hier wurde die Schweinegülle in 300 L-Gebinden bei 8 °C in offenen Tanks gelagert. Der maximale Konzentrationsrückgang der Tetracyclin-Konzentration betrug etwa 50 % über einen Zeitraum von 7 Wochen. Nach einer Inkubationsdauer von 150 Tagen war immer noch Tetracyclin in der Gülle nachweisbar, wobei hier von den Autoren keine Konzentration angegeben wird.

Auch für Sulfonamide ergaben sich im Vergleich verschiedener Studien unterschiedliche Ergebnisse. Langhammer (1989) beurteilte das Sulfonamid Sulfadimidin nach Zugabe der Substanz zu Schweinegülle als persistent, da nach 11-wöchiger Lagerung der Gülle im Stall noch bis zu 90 % der Ausgangskonzentration nachzuweisen waren. Ein etwas anders Bild ergab sich für Sulfadimidin und Sulfathiazol in Schweinegülle nach vorheriger Verabreichung der Substanzen an die Tiere. Hier waren nach 5-wöchiger Lagerung unter nicht genau spezifizierten winterlichen Freilandbedingungen noch 40 bis 60 % der Ausgangsverbindung nachweisbar (Langhammer, 1989). Grote (2005) konnten sogar nach Verabreichung von Sulfadiazin an Mastschweine und anschließender 8-monatiger Freiland-Lagerung der Gülle in 200-300 L-Chargen noch ca.  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  Sulfadiazin (ca. 36 %) nachweisen.

Winckler et al. (2004) deuteten hingegen nach einer rückstandsanalytischen Screening-Analyse von 176 Schweinegülleproben aus dem Weser-Ems-Gebiet, dass Sulfonamide in Gülle eine geringe Persistenz aufweisen. Zugrunde lagen hier die nachgewiesenen Konzentrationen von durchschnittlich  $4.9 \text{ mg Sulfadiazin kg}^{-1}$  Gülle, wobei die Messergebnisse mit  $0.7$  bis  $35.3 \text{ mg kg}^{-1}$  eine große Schwankungsbreite aufwiesen. Boxall et al. (2004) gaben für Sulfonamide insgesamt  $DT_{50}$  Werten  $< 30$  Tage und damit einen relativ schnellen Abbau in Gülle an. In Abbauuntersuchungen in Rindergülle nach direkter Zugabe der Substanzen und Inkubation bei  $20 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  im Labor konnte von Kreuzig und Höltge (2005) ebenfalls eine schnelle Konzentrationsabnahme für Sulfadiazin mit einem  $DT_{50}$ -Wert von 17 Tagen ermittelt werden. Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass auf Grundlage der Persistenzkriterien für die Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln mit einer Mineralisation  $< 5 \%$  und einer Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände  $> 70 \%$  in 100 Tagen (BBA, 1998) Sulfadiazin durchaus als persistent anzusehen ist.

Differenzen ergeben sich ebenfalls in den Literaturangaben zu Ausscheidungsprodukten von Sulfonamiden. Eine Studie von Berger et al. (1986) zeigte, dass bei einer Verabreichung von Sulfadimidin an Mastschweine  $46 \%$  des Wirkstoffs im Exkret nachzuweisen war, wovon  $50 \%$  auf die acetylierte Form (Acetyl-Sulfadimidin) entfiel. Auch Langhammer (1989) zeigt für Sulfadimidin und Sulfathiazol nach Absatzferkelbehandlung Anteile von  $35$  bzw.  $53 \%$  der acetylierten Metaboliten. Haller et al. (2002) hingegen detektierten eine Sulfadimidin-Konzentration in Höhe von maximal  $11.3 \text{ mg kg}^{-1}$  einschließlich des Metaboliten Acetyl-Sulfadimidin in Schweinegülleproben, wobei die Konzentration des Metaboliten  $2$  bis  $50$  mal niedriger war als die der Ausgangssubstanz. Grote (2005) konnte nach Applikation von Sulfadiazin an Mastschweinen  $60 \%$  der ausgeschiedenen Gesamtmenge von  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  als den Metaboliten Acetyl-Sulfadiazin identifizieren. Aus den zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen der dargestellten Untersuchungen wird die Notwendigkeit eines einheitlichen Testverfahrens zur Bestimmung des Abbauverhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle deutlich, wie bereits 1994 von Bouwman und Reus gefordert.

Montforts (1999) schlug im Report des niederländischen Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) eine Methodenliste zur Untersuchung von Tierarzneimitteln in Gülle vor. Hiernach sollte das Testverfahren (Labortest/Test unter praxisnahen Bedingungen, aerob/anaerob, steril/unsteril), die Testsubstanz, die radioaktive Markierung, die Applikationsmethode, die Menge der untersuchten Gülle, die Lagerungsbedingungen (Temperatur, Inkubationsdauer, Lichtverhältnisse) sowie die Extraktions- und Analysemethoden festgelegt werden. Zudem sollten die mikrobielle Aktivität, der pH-Wert sowie der Wassergehalt der eingesetzten Gülle bekannt sein. In einem Informationsblatt des RIVM

zur toxikologischen Risikoabschätzung wird dieser Ansatz noch einmal aufgegriffen und die zu berücksichtigenden Parameter ausführlich beschrieben (van Vlaardingen et al., 2001). Allerdings findet diese Methodenliste der aktualisierten Version des RIVM-Reports (Montforts, 2003) keine Beachtung mehr.

Im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Verbundforschungsprojektes Environmental Risk Assessment of Veterinary Medicines in Slurry (ERAVMIS) wurde von 2002-2003 das Verhalten von Antibiotika aus der Tiermedizin in der Umwelt und ihrer Auswirkungen untersucht. Speziell wurden hier Abbau- und Sorptionsuntersuchungen sowie ökotoxikologische Untersuchungen mit ausgewählten Antibiotika aus der Gruppe der Tetracycline (Oxytetracyclin), Sulfonamide (Sulfachloropyridazin) und Makrolid-Antibiotika (Tylosin) im Labor und im Freiland durchgeführt (Boxall et al., 2002; 2003; Halling-Sørensen et al., 2003; 2002; Tolls, 2001). Durch einen abschließenden Modellentwurf wurden die Risiken für die Umwelt in Europa durch Tierarzneimittel abgeschätzt (Montforts und Tarazona Lafarga, 2003; Montforts et al., 2003). Der verwendete Entwurf beruhte auf einem realistischen worst-case-Modellansatz. Dieser beinhaltet die einmalige Behandlung eines Tierbestandes, wobei in einem Ausscheidungszeitraum von 30 Tagen alle Rückstände in der Gülle enthalten sein sollten. Zudem werden die europäischen Standardwerte für die Stickstoffproduktion eines Tierbestandes ( $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$  für Milchkühe,  $6,5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$  für Mastschweine) zugrunde gelegt sowie eine jährliche Applikationsrate von  $170 \text{ kg Stickstoff pro Hektar}$  in den oberen 5 cm des Bodens. Der Modellentwurf beruht nicht zuletzt auf der Annahme, dass die Substanzen während der Güllelage keinen Veränderungen bzw. keinem Abbau unterliegen und die Gülle nicht zusätzlich behandelt wird (Montfort et al. 2003). Allerdings wurden hierzu keine konkreten Untersuchungen durchgeführt, nicht zuletzt aufgrund der nicht validierten Methoden für die Untersuchung des Verhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle.

Ziel des seit 2004 existierenden EU-Projektes Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPharm) ist die Verbesserung und Vervollständigung der Untersuchungsmethoden für die Risikoabschätzung von Human- und Tierarzneimitteln in der Umwelt. Zum einen werden hier Untersuchungen zum Verhalten und Expositionsabschätzung von Arzneimitteln unter Berücksichtigung des Eintragspfades über Weidetiere, Gülle und Klärschlamm in den Boden durchgeführt. Zum anderen werden Effektabschätzungen anhand von Ökotoxizitätstests und in Anlehnung daran eine Risikoabschätzung erfolgen (Knacker et al., 2005).

Im dem vom Umweltbundesamt (UBA) geförderten Forschungsvorhaben "Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide" ("Runoff-Projekt"), welches im Institut für Ökologische Chemie und

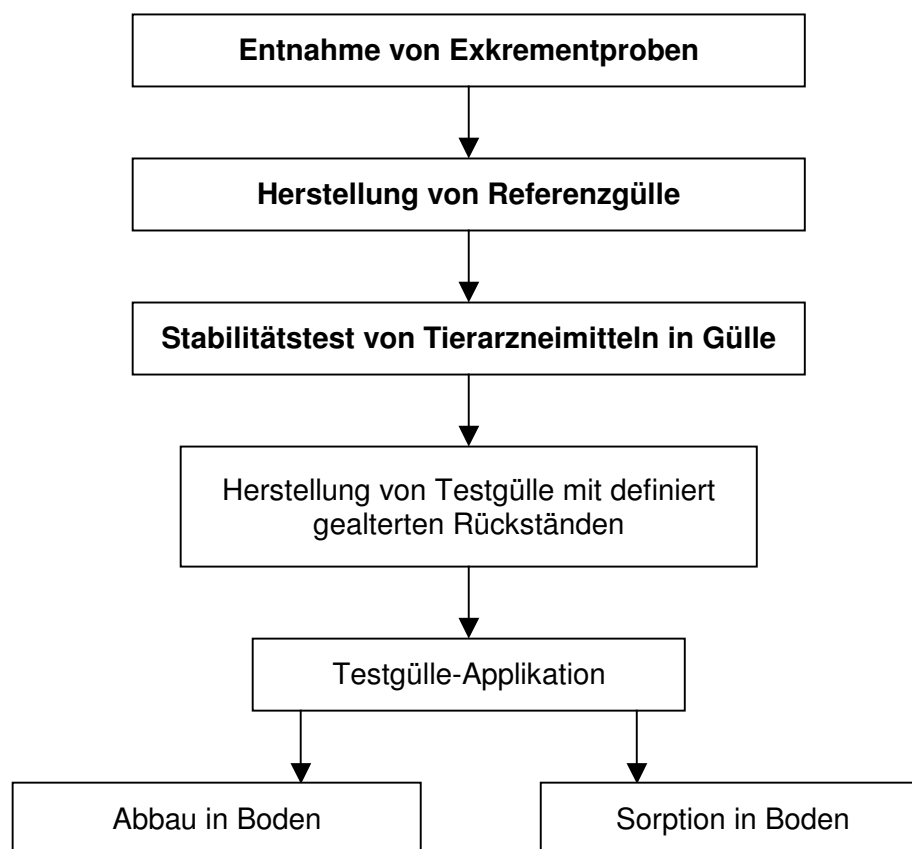
Abfallanalytik, Technische Universität (TU) Braunschweig, von 2002-2004 bearbeitet wurde, wurde das Rückstands- und Abflussverhalten ausgewählter Veterinärpharmaka nach Starkregenereignissen von güllegedüngten Acker- und Grünlandflächen untersucht (Kreuzig et al., 2007). Im Rahmen dieses Projektes wurde zudem das Abbau- und Sorptionsverhalten im Boden in Labortestsystemen ermittelt. Dabei wurden die  $^{14}\text{C}$ -markierten Radiotracer in Anlehnung an die Pflanzenschutzmittelzulassung als Standardlösung zu den Bodenproben dotiert. Zudem wurden erste Stabilitätstests der Testsubstanzen in Rinder- und Schweinegülle durchgeführt und auf dieser Basis Testgülle mit definiert gealterten Veterinärpharmaka-Rückständen hergestellt und diese zu Bodenproben dotiert. Damit wurde im Labortest der tatsächliche Eintragspfad von Tierarzneimitteln in Böden berücksichtigt. Aus den vergleichenden Untersuchungen nach Standard- und Testgülle-Applikation geht hervor, dass die Rückstandsdynamik der Tierarzneimittel in Böden durch den Einsatz der Gülle deutlich beeinflusst wird (Kreuzig und Höltge, 2005).

Des weiteren existiert seit April 2005 eine Forschergruppe der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG-Forschergruppe 566) zu dem Thema: „Tierarzneimittel in Böden: Grundlagen zur Risikobewertung“. Das insgesamt aus 8 Teilprojekten bestehende Projekt lässt sich in drei Bereiche unterteilen: A: Dynamik von Tierarzneimitteln im Boden, B: Wirkungen von Tierarzneimitteln im Boden, C: Modellierung der Rückstands- und Wirkungsdynamik von Tierarzneimittel im Boden. Ziel ist eine wissenschaftlich fundierte Grundlage für die Risikobewertung der Tierarzneimitteln durch die Identifikation, Quantifizierung und Modellierung der wesentlichen Reaktions-, Transport-, Bindungs-, Alterungs- und Wirkungsmechanismen am Beispiel von Sulfadiazin und Difloxacin und deren Metaboliten, die über Gülle in Böden eingebracht werden. Für alle Untersuchungen wird Schweinegülle verwendet, welche die  $^{14}\text{C}$ -markierten Antibiotikarückstände nach Verabreichung der Substanzen an das Tier enthält. Durch diese Methode kann jedoch eine reproduzierbare Zusammensetzung der Gülle selbst sowie der darin enthaltenen Rückstände nicht gewährleistet werden.

Im Vordergrund des vom Umweltbundesamt geförderten Projektes „Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden: Die Erarbeitung eines Methodenkataloges für Labortests“ (UBA-FKZ 204 67 455, 2004-2006), welches im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik der TU Braunschweig bearbeitet wurde, stand die Methodenentwicklung für die Durchführung von Stabilitätstests von Tierarzneimitteln in Gülle sowie Abbautests in güllegedüngten Böden. Im ersten Schritt wurde ein Methodenkatalog zur Charakterisierung der in den Labortest eingesetzten Gülleproben und zur Bestimmung der Stabilität von Tierarzneimittel in Gülle in Form von Standard-Arbeitsanweisungen (SOP)

entwickelt. Darauf basierend wurden Stabilitätstests mit unterschiedlichen Substanzen und Güllematrizes durchgeführt. Neben den Sulfonamiden Sulfadiazin, Sulfamethoxazol und dessen Metabolit Acetyl-Sulfamethoxazol wurden die Analgetika Paracetamol sowie Ketoprofen und das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin untersucht.

Auf der Grundlage der Stabilitätstests wurde im zweiten Schritt Testgülle mit definiert gealterten Rückständen hergestellt und in Labortestsystemen eingesetzt, um den Abbau und die Sorption von Tierarzneimitteln in güllegedüngten Böden zu untersuchen. Diese Untersuchungen erfolgten unter Einsatz umfassend charakterisierter Rinder- und Schweinegülle, um den Einfluss verschiedener Güllematrizes zu berücksichtigen (**Abb. 3**). Im Gegensatz zu den OECD-Richtlinien zur Prüfung von Chemikalien (OECD, 2000, 2002), wo eine Applikation der Testsubstanzen auf den Boden ausschließlich als Standard-Lösung erfolgt, wurde im „Gülle-Projekt“ der tatsächliche Eintragspfad von Tierarzneimitteln in Böden berücksichtigt (Kreuzig et al., 2006). Auf Grundlage der entwickelten Standardarbeitsanweisungen konnte eine Möglichkeit für den reproduzierbaren Einsatz von Gülle in Labortests aufgezeigt werden.



**Abb. 3: Forschungskonzept des „Gülle-Projekts“**

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen des vom Umweltbundesamt geförderten Forschungsvorhabens „Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden: Die Erarbeitung eines Methodenkataloges für Labortests“, UBA-FKZ 204 67 455, kurz „Gülle-Projekt“, galt es einen Methodenkatalog für Labortests zum Rückstandsverhalten von Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden zu erarbeiten. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung der Stabilitätstests in Rinder- und Schweinegülle anhand der Testsubstanzen Sulfamethoxazol, Acetyl-Sulfamethoxazol und Sulfadiazin. Im Gegensatz zu bisher durchgeführten Abbaustudien für Tierarzneimittel in Gülle, in denen Gülleproben aus praxisüblichen Gülletanks entnommen wurden (Kühne et al., 2000; Langhammer, 1989; Loke et al., 2003), sollte hier ein innovativer Ansatz verfolgt werden. Um eine repräsentative und reproduzierbare Gülle für den Einsatz im Labortest zu gewährleisten, sollten Exkrementen von Einzeltieren entnommen werden, welche unter definierten Fütterungsbedingungen gehalten wurden.

Um die reproduzierbaren Versuchsbedingungen gewährleisten zu können, galt es, Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung von Exkrementen und Gülle zu entwickeln. In Anlehnung an die Untersuchung von Abwasser, Schlamm und Boden sollte eine umfassende Matrixcharakterisierung anhand folgender Parameter erfolgen: Trockensubstanz (TS), mineralischer Gehalt ( $R_{\min}$ ), Kupfer- und Phosphor-Gehalt (Cu, P), organischer Gesamt-Kohlenstoff (TOC), pH-Wert, Redox-Potential (Eh), gelöster Sauerstoff ( $O_2$ ), Ammonium-Stickstoff ( $NH_4-N$ ), Gesamt-Stickstoff ( $N_{\text{total}}$ ), biologischer Sauerstoffbedarf ( $BSB_5$ ) und chemischer Sauerstoffbedarf (CSB).

Entsprechend der in der Literatur angegebenen mittleren Trockensubstanzgehalte für Gülle (ATV-DVWK, 2001; Merkel, 2005; Skark und Zullei-Seibert, 2001), galt es, aus den charakterisierten Exkrementen durch Zugabe von Trinkwasser Referenzgülleproben mit einem Trockensubstanzgehalt von 10 % für Rindergülle und 5 % für Schweinegülle herzustellen. Vor dem Einsatz der Referenzgülle in den Stabilitätstests sollte erneut eine umfassende Matrixcharakterisierung durchgeführt werden.

Nach der Herstellung reproduzierbarer Güllematrizes galt es, einen Methodenkatalog für den Test zum Verhalten von Tierarzneimitteln in Rinder- und Schweinegülle zu entwickeln und die Validität des Testsystems anhand von Stabilitätstests mit verschiedenen Sulfonamiden zu überprüfen. Zur Durchführung der Stabilitätstests unter Verwendung der Referenzgülle wurden für diese Arbeit die Sulfonamide Sulfamethoxazol, dessen Hauptmetabolit Acetyl-Sulfamethoxazol sowie Sulfadiazin ausgewählt. Diese Substanzen wurden als  $^{14}C$ -markierte Radiotracer eingesetzt, um eine vollständige Bilanzierung unter

Berücksichtigung der Mineralisation, der extrahierbaren Rückstände sowie der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände zu ermöglichen. Unter Berücksichtigung der in der landwirtschaftlichen Praxis üblichen Lagerungsbedingungen von Gülle (Burton et al., 2003; Düngeverordnung, 2006) wurden Langzeittests unter anaeroben Milieubedingungen über 100 bzw. 177 Tage durchgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Langzeittests sollten die Tests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol exemplarisch nach einem Jahr wiederholt werden. Um die Zusammensetzung der Gülle über die gesamte Inkubationszeit untersuchen zu können, galt es, zusätzlich Matrixcharakterisierungstests mit unmarkierten Substanzen zu inkubieren und die Gülle nach Ende der jeweiligen Inkubationsintervalle einer vollständigen Charakterisierung zu unterziehen. Die Durchführung eines Metaboliten-Screenings sollte zusätzliche eine Differenzierung zwischen Ausgangsubstanz und Metaboliten ermöglichen. Es war jedoch nicht Ziel der Arbeit, im Sinne von Abbaustudien Metabolismuswege aufzuzeigen bzw. Metaboliten zu identifizieren.

Um den Einfluss der Inkubationstemperatur sowie des Trockensubstanzgehalts auf die Stabilität der Sulfonamide in Gülle aufzuzeigen, sollten zusätzliche Kurzzeittests mit einer Inkubationsdauer bis 30 Tagen durchgeführt werden. Des Weiteren galt es, in Kurzzeittests Effekte verschiedener Güllematrizes auf die Stabilität von Sulfamethoxazol in Rinder- und Schweinegülle zu erfassen.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Eingesetzte Exkreme und Gülle

Aufgrund der Problematik bei der Entnahme von Gülleproben mit einer reproduzierbaren Zusammensetzung aus der landwirtschaftlichen Praxis (Kapitel 1.2), wurde im „Gülle-Projekt“ ein innovativer Ansatz zur Herstellung von reproduzierbaren Referenzgülleproben für den Einsatz in Labortests verfolgt. Hierzu wurden Exkreme von Einzeltieren, welche unter definierten Bedingungen gehalten wurden, ausgewählt. Um die Variabilität der Matrices durch die nach der Ausscheidung schnell ablaufenden Umsetzungsprozesse weiter einzuschränken, wurden die Exkreme einer Konditionierungsphase unterzogen. Nach dem Erreichen konstanter Milieubedingungen wurden die Exkreme zur Herstellung der Referenzgülle verwendet bzw. für eine spätere Gülleherstellung gelagert. Die Zusammensetzung der Exkreme und Referenzgülle wurde anhand einer umfassenden Matrixcharakterisierung überprüft.

##### 3.1.1 Auswahl der verwendeten Exkreme

Für die Herstellung von Referenzgülle wurden sowohl Rinder- als auch Schweineexkreme verwendet. Die Rinderexkreme (RE) stammten von konventionell gefütterten Einzeltieren, die Schweineexkreme (SE) von Gruppen mit 4 bis 6 Tieren. Die Entnahmepériode variierte zwischen 12 und 24 h. Es wurden je 6 verschiedene Rinder- und Schweineexkreme in einem Zeitraum von insgesamt 18 Monaten entnommen, wobei jeweils 5 der 6 Exkreme aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Braunschweig stammten. Die beiden anderen Exkreme wurden von einem Milchviehbetrieb bzw. einem Schweinemastbetrieb in Ohrdorf bzw. Erpensen, Kreis Gifhorn, Niedersachsen, entnommen.

Die eingesetzten Rinderexkreme (**Tab. 4**) stammten von Milchkühen und einem Jungrind der Rasse Deutsche Holstein Schwarzbunt. Die Auswahl der Exkreme beruhte darauf, dass mit 32 % der Hauptteil des Rinderbestandes von 13 Millionen Rindern in Deutschland auf Milchvieh entfällt (Statistisches Bundesamt, 2006). Die Exkreme RE-2 wurden von einem Jungrind entnommen, da Kälber und Jungrinder mit 31 % den zweitgrößten Anteil am Deutschen Rinderbestand ausmachen. Entsprechend des herbivoren Ernährungstyps von Rindern wurden alle Milchkühe nach der gängigen Fütterungspraxis mit Raufutter (Silagen, Heu) sowie Kraft- und Mineralfuttermischungen

gefüttert. Das Jungrind bekam weder Kraft- noch Mineralfutter. Die Wasseraufnahme erfolgte aus Selbsttränken nach Bedarf.

**Tab. 4: Eingesetzte Rinderexkreme**

Exkrement	Herkunft	Alter der Tiere	Bezeichnung	Fütterung
<b>RE-1</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	5 Jahre	Milchkuh	Maissilage, Grassilage, Weizensilage, Kraftfutter, Mineralfutter
<b>RE-2</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	8 Monate	Jungrind	Maissilage, Grassilage, Weizensilage
<b>RE-3</b>	Hof Meyer, Ohrdorf	5 Jahre	Milchkuh	Maissilage, Grassilage, Heu, Kraftfutter, Mineralfutter
<b>RE-4</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	5 Jahre	Milchkuh	Maissilage, Kraftfutter, Mineralfutter
<b>RE-5</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	4 Jahre	Milchkuh	Grassilage, Maissilage, Kraftfutter, Mineralfutter
<b>RE-6</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	5 Jahre	Milchkuh	Grassilage, Maissilage, Kraftfutter, Mineralfutter

RE: Rinderexkrement, FAL: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft; Rasse: Deutsche Holstein Schwarzbunt

Die eingesetzten Schweineexkreme (Tab. 5) stammten alle von einer gängigen Mastschweingebräuchskreuzung aus dem Bundeshybridzuchtprogramm (BHZP). Das Alter der Tiere von 4 bis 12 Monaten entsprach in etwa einem Gewicht von ca. 40-115 kg je Tier. Es wurden Exkreme von Mastschweine ausgewählt, da Mastschweine in Deutschland mit 40 % den größten Anteil des Gesamtbestandes von 27 Millionen Schweinen ausmachen (Statistisches Bundesamt, 2006). Die Tiere aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung wurden überwiegend nach den für Mastschweine üblichen Fütterungsbedingungen mit Getreidemischungen, Vitamin/Mineralstoff/Spurenelement-Mischungen sowie Sojaprodukten gefüttert, wobei das Exkrement SE-2 von Tieren aus einem Fütterungsversuch mit einem erhöhten Weizenanteil von 50 % stammte. Aufgrund des omnivoren Ernährungstyps von Schweinen kann die Fütterung jedoch stark variieren. So wurden die Tiere des Mastbetriebs in Erpensen (SE-3) aufgrund der räumlichen Nähe eines kartoffelverarbeitenden Betriebs zu einem Großteil mit Kartoffelabfällen gefüttert.

Die Futteraufnahme betrug in etwa 3.5 kg je Tier und Tag, die Wasseraufnahme erfolgte aus Selbsttränken nach Bedarf.

**Tab. 5: Eingesetzte Schweineexkreme**

<b>Exkrement</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Alter der Tiere</b>	<b>Fütterung</b>
<b>SE-1</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	6 Monate	Gerste 46%, Weizen 35%, Sojaextraktionsschrot 15%, Sojaöl 1.5%, Vitamine / Mineralstoffe / Spurenelemente 2%, kristalline Aminosäuren 0.5%
<b>SE-2</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	12 Monate	Gerste 25%, Weizen 50%, Sojaextraktionsschrot 20%, Sojaöl 2%, Vitamine / Mineralstoffe / Spurenelemente 3%
<b>SE-3</b>	Hof Beyer, Erpensen	6-8 Monate	Kartoffelabfall 60%, Weizen/Gerste 30%, Sojaextraktionsschrot/Sojaöl 7%, Vitamine / Mineralstoffe / Spurenelemente 3%
<b>SE-4</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	4 Monate	Gerste 46%, Weizen 35%, Sojaextraktionsschrot 15%, Sojaöl 1.5%, Vitamine / Mineralstoffe / Spurenelemente 2%, kristalline Aminosäuren 0.5%
<b>SE-5</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	4 Monate	Gerste 37%, Weizen 27.5%, Triticale 12.5%, Sojaextraktionsschrot 18%, Sojaöl 2%, Vitamine / Mineralstoffe / Spurenelemente 3%
<b>SE-6</b>	Instituts für Tierernährung, FAL	7 Monate	Gerste 46%, Weizen 35%, Sojaextraktionsschrot 15%, Sojaöl 1.5%, Vitamine/Mineralstoffe / Spurenelemente / kristalline Aminosäuren 2.5 %

SE: Schweineexkrement, FAL: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Rasse: Mastschwein-Gebrauchskreuzung aus dem Bundeshybridzuchtprogramm (BHZP)

### 3.1.2 Bestimmungsmethoden der Parameter zur Matrixcharakterisierung

Die Auswahl und Bestimmung der angegebenen Parameter zur Charakterisierung der Exkrement- und Gülle-Proben erfolgte in Anlehnung an Methoden zur Untersuchungen von Gülle bzw. zur Untersuchung von Klärschlämmen, Abwässern und Böden (Hahne, 2001; Hüther, 1999; Møller et al., 2004; Schuchhardt und Hahne, 1996). Für die Bestimmung der Parameter wurde neben dem angegebenen Equipment die Standard-Laboraausstattung verwendet. Alle genutzten Chemikalien waren von analytischer

Reinheit. Zur Qualitätssicherung erfolgten die Messungen jeweils in Doppelbestimmung, abgesehen von der Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfes.

Die Dichte von Gülle liegt nach Baader et al. (1977) zwischen 1020 und 1080 kg m<sup>-3</sup> und damit etwa im Dichtebereich von Wasser (1013 kg m<sup>-3</sup> unter Normaldruck). Auch Schuchardt und Hahne (1996) sowie Buning (1997) geben für Schweine- und Rindergülle eine Dichte von 1000 kg m<sup>-3</sup> bzw. 1018 und 1032 kg m<sup>-3</sup> an. Damit entspricht die Angabe von g kg<sup>-1</sup> der Angabe von g L<sup>-1</sup>.

### **Trockensubstanzgehalt (TS)**

Für die Trocknung der Proben bei 105 °C in Anlehnung an DIN ISO 11465 (1996) wurden 2 bis 6 g der homogenisierten Probe in einen für 30 min bei 105 °C im Trockenschrank erwärmten und anschließend abgekühlten Tiegel eingewogen. Die Trocknung der Probe erfolgte über Nacht bei 105 °C im Trockenschrank. Nach dem Abkühlen der Probe im Exsikkator erfolgte die Bestimmung der Auswaage. Die Proben wurden nach der ersten Bestimmung des Massenverlustes ein weiteres Mal für 1 h bei 105 ± 5 °C getrocknet. Bei einer Abweichung der Messergebnisse < 0.5 % wurde die Trockensubstanz als konstant angesehen.

Alternativ zur Methode nach DIN ISO 11465 (1996) erfolgte die Trocknung der Exkrement- und Gülle-Proben mittels Ultra-X-Infrarotstrahler (Gronert, Deutschland). Hierzu wurden 1 bis 6 g der homogenisierten Probe mittels Spatel gleichmäßig auf dem Wägeteller aufgebracht und die Einwaage dokumentiert. Durch Aktivierung des über dem Wägeteller angebrachten Infrarot-Strahlers wurde die Probe erwärmt und das enthaltene Wasser ausgetrieben. Nach Erreichen der Massenkonzanz wurde die Auswaage dokumentiert und die Massendifferenz vor und nach dem Trocknen zur Berechnung des Trockensubstanzgehalts (TS) herangezogen. Die Angabe erfolgte in Prozent mit einer Genauigkeit von ± 1 %:

$$TS = \frac{m_b \cdot 100 \%}{m_a}$$

$$TS = 100 \% - w_{H_2O}$$

$m_b$ : Auswaage [g]

$m_a$ : Einwaage [g]

$w_{H_2O}$ : Wassergehalt [%]

### **Mineralischer Gehalt (R<sub>min</sub>)**

Vor der Bestimmung des mineralischen Gehalts von Exkrement- oder Gülle-Proben in Anlehnung an DIN EN 12879-S3a (2001) wurden die Proben, wie zur Bestimmung der

Trockensubstanz beschrieben, bei 105 °C getrocknet und anschließend homogenisiert. Von der so vorbereiteten Probe wurden 0.1 bis 1.0 g in Porzellantiegel mit Deckel eingewogen, welche zuvor für 30 min bei 550 ± 25 °C im Muffelofen (Haereus, Deutschland) ausgeglüht und anschließend im Exsikkator abgekühlt wurden. Die Tiegel wurden mit geöffnetem Deckel im Muffelofen platziert und dieser auf 550 ± 25 °C erwärmt. Nach Erreichen der Temperaturkonstanz wurden die Proben 4 h geglüht und anschließend mit geschlossenem Deckel im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Bestimmung der Auswaage wurden die Proben ein weiteres Mal für 30 Minuten bei 550 ± 25 °C geglüht und erneut die Auswaage bestimmt. Bei einer Abweichung der Messergebnisse < 0.5 % wurde der Glühverlust als konstant angesehen. Die Massendifferenz vor und nach dem Glühen wurde zur Berechnung des mineralischen Gehalts herangezogen. Die Angabe erfolgte in Prozent mit einer Genauigkeit von ± 1 %.

$$R_{\min} = 100 - \frac{(m_c - m_a) \cdot 100}{(m_b - m_a)}$$

$m_a$ : Masse des leeren Tiegels [g]

$m_b$ : Masse des Tiegels plus Einwaage [g]

$m_c$ : Masse des Tiegels plus Auswaage [g]

Zur Qualitätssicherung wurde der mineralische Gehalt von drei Rinderexkrementen im zeitlichen Abstand von 80 Tagen ein zweites Mal bestimmt.

### **Kupfer- und Phosphor-Gehalt (Cu, P)**

Zur Bestimmung der Menge der in den Exkrement- bzw. Gülle-Proben enthaltenen Elemente Cu und P in Anlehnung an DIN EN ISO 11885 (1998) wurde nach mikrowellen-induziertem Aufschluss der Proben eine Elementanalyse mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma (ICP-OES) durchgeführt (ICP-OES System Vista-MPX CCD simultane ICP-OES, Varian, Palo Alto, CA, USA). Die Exkrement- oder Gülle-Probe wurde, wie zur Bestimmung der Trockensubstanz beschrieben, bei 105 °C getrocknet und anschließend homogenisiert. Anschließend wurden Aliquote von 100 bis 200 mg unter Zugabe von 8 mL Salpetersäure, 2 mL Wasserstoffperoxid und 2 mL Reinstwasser einem mikrowelleninduziertem Aufschluss (Mikrowelle Start System mit Terminal 320, MLS, MWS-Vertrieb GmbH, Leutkirchen, Deutschland) unterzogen (Temperaturprogramm siehe **Tab. 6**). Zusätzlich wurde eine Blindprobe ohne Probeneinwaage in gleicher Weise aufgeschlossen. Die externe Kalibrierung wurde mit Standard-Lösungen in Konzentrationen von 0.01 bis 500

mg L<sup>-1</sup> durchgeführt, wobei ein Korrelationskoeffizient von  $r^2 = 0.999$  akzeptiert wurde. Andernfalls wurden die Daten nicht in die Auswertung einbezogen und die Messung wiederholt. Die Angabe der Elementkonzentration erfolgte in mg kg<sup>-1</sup> Frischgewicht. Ergebnisse größer als 1000 mg kg<sup>-1</sup> wurden in g kg<sup>-1</sup> mit einer Dezimalstelle angegeben.

$$E_{TS} = \frac{c \cdot V}{m} \quad E_F = \frac{E_{TS} \cdot TS}{m}$$

$E_{TS}$ : Konzentration des Elements [mg kg<sup>-1</sup> Trockensubstanz]  
 $c$ : Elementkonzentration der analysierten Probe [mg L<sup>-1</sup>]  
 $m$ : Proben-Einwaage [g]  
 $V$ : Proben-Volumen nach Aufschluss [mL]  
 $E_F$ : Masse des Elements [mg kg<sup>-1</sup> Frischgewicht]  
 $TS$ : Trockensubstanz der Probe [%]

**Tab. 6: Temperaturprogramm für den mikrowelleninduzierten Probenaufschluss**

Zeit [min]	Watt [W]	Temperatur [°C]
2.5	700	75
8.0	500	100
12.0	500	120
16.0	500	150
20.0	500	170
24.0	900	200
54.0	900	200

Zur Qualitätssicherung wurden für die Bestimmung von Kupfer 4 Emissionslinien in Anlehnung an DIN EN ISO 11885 ( $\lambda = 223.009$  nm,  $\lambda = 224.700$  nm,  $\lambda = 324.754$  nm,  $\lambda = 327.395$  nm) und für Bestimmung von Phosphor 2 Emissionslinien ( $\lambda = 213.618$  nm,  $\lambda = 214.914$  nm) herangezogen sowie Wiederfindungsraten (WFR) des Standards von 90 bis 110 % akzeptiert.

### Organischer Gesamt-Kohlenstoff (TOC)

Die Bestimmung des in den Exkrement- und Gülle-Proben enthaltenen organischen Kohlenstoffs erfolgte in Anlehnung an DIN ISO 10694 (1996). Hierbei wird der organische Kohlenstoff bei 900 °C in reiner Sauerstoffatmosphäre zu Kohlendioxid oxidiert und mittels

Infrarot-Detektor gemessen (C-Analysator Dohrmann DC-90 mit Infrarot-Detektor Fuji 3300, Dohrmann, Santa Clara, CA, USA). Vor der Oxidation wurden die Proben, wie zur Bestimmung der Trockensubstanz beschrieben, bei 105 °C getrocknet und anschließend homogenisiert.

Der in den getrockneten Proben enthaltene anorganische Kohlenstoff wurde durch Zugabe von Salzsäure (4 M) im Überschuss und anschließendes Erhitzen auf 100 °C bis zum vollständigen Verdampfen der Salzsäure ausgetrieben. Die Probe wurde anschließend nochmals bei 105 °C getrocknet, homogenisiert und mit Aluminiumoxid verdünnt (1:20). Die Messung erfolgte nach Einwaage von 1 und 8 mg der Probe. Die externe Kalibrierung wurde mit einem Oxalsäuredihydrat/Aluminiumoxid-Standard (1:9) in Konzentrationen von 19.05 bis 190.5 µg C durchgeführt, wobei ein Korrelationskoeffizient von  $r^2 = 0.995$  akzeptiert wurde. Andernfalls wurden die Daten nicht in die Auswertung einbezogen und die Messung wiederholt. Der organische Kohlenstoff-Gehalt wurde in g kg<sup>-1</sup> Frischgewicht mit einer Genauigkeit von 1 g kg<sup>-1</sup> angegeben. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{TOC}_{\text{FG}} = \frac{m_c \cdot f}{m_a} \cdot 10 \cdot \text{TS}$$

FG: Frischgewicht

$m_c$ : Menge an Kohlenstoff [µg]

$m_a$ : Einwaage [µg]

f: Verdünnungsfaktor

10: Umrechnungsfaktor auf 1 kg Exkrement oder Gülle

TS: Trockensubstanz [%]

Zur Qualitätssicherung wurde zusätzlich ein Kaliumhydrogenphthalat/Aluminiumoxid-Standard (1:25) mit einem errechneten Gehalt von 1.882 % C analysiert, wobei Wiederfindungsraten von 90 bis 110 % akzeptiert wurden. Andernfalls wurden die Daten nicht in die Auswertung einbezogen und die Messung wiederholt.

### **pH-Wert**

Der pH-Wert wurde in Anlehnung an DIN EN 12176 (1998) mittels pH-Elektrode direkt in mindestens 50 bis 100 g der homogenisierten Probe gemessen (pH Multical 535 GLP mit pH-Glaselektrode SenTix 61, WTW, Weilheim, Deutschland). Der Wert wurde als stabil angesehen, wenn im Verlauf von 5 Sekunden die Anzeige um nicht mehr als 0.02 Einheiten variierte. Die Angabe erfolgte mit einer Dezimalstelle. Das Messgerät wurde regelmäßige mittels geeigneter Pufferlösungen mit pH 4.0, pH 7.0 und pH 9.2 (Puffertabletten, Fluka, Merck, Darmstadt, Deutschland) überprüft bzw. kalibriert.

**Redox-Potential (Eh)**

Das Redoxpotential wurde in Anlehnung an DIN 38404-6 (1984) mittels Redox-Elektrode direkt in 50 bis 100 g der homogenisierten Exkrement- bzw. Gülle-Probe gemessen (pH Multical 535 GLP 8, WTW, Weilheim, Deutschland mit Inolab Redox Einstabmesskette, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland). Der Wert wurde als stabil angesehen, wenn im Verlauf von 5 Minuten die Anzeige um nicht mehr als 5 mV variierte. Die gemessenen Werte ( $U_G$ ) wurden auf die Standardwasserstoffelektrode ( $U_H$ ) durch addieren der Standardspannung der eingesetzten Bezugselektrode ( $U_B$ ) umgerechnet (hier + 211 mV) und nach DIN 38404-6 (1984) auf 10 mV gerundet.

$$U_H = U_G + U_B$$

Es erfolgte eine regelmäßige Überprüfung der Elektrode mittels Redox-Pufferlösung pH 7,  $U_H = 427$  mV bei 25 °C (WTW, Weilheim, Deutschland), entspricht  $U_G = 228$  mV bei 20 °C mit Inolab Redox Einstabmesskette.

**Gelöster Sauerstoff ( $O_2$ )**

Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff in Exkrement- und Gülle-Proben wurde in Anlehnung an DIN EN 25814 (1992) mittels elektrochemischem Verfahren bestimmt (Oxi 340i mit CelloX 325 Sauerstoffelektrode, WTW, Weilheim, Deutschland). Dieses Verfahren beruht auf der Messung des gelösten Sauerstoffs in wässrigen Medien mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode, welche von der Probe durch eine gasdurchlässige Membran getrennt ist. Die Messung erfolgte direkt in 50 bis 100 g der homogenisierten Probe. Während der Sauerstoffmessungen war die automatische Driftkontrolle des Sauerstoffmessgerätes nicht aktiviert, da aufgrund der geringen Sauerstoffgehalte der Proben das Erreichen eines stabilen Messwertes den geräteinternen, zeitabhängigen Messmodus überschritten hätte. Die Messergebnisse wurden in  $mg\ O_2\ kg^{-1}$  Frischgewicht mit einer Dezimalstelle für Werte größer  $0.1\ mg\ O_2\ kg^{-1}$  angegeben. Werte  $< 0.1\ mg\ O_2\ kg^{-1}$  konnten aufgrund der gerätebedingten Messungenauigkeit nicht präziser angegeben werden. Vor jeder Messung wurde die Elektrode mittels Kalibriergefäß OxiCal-SL (WTW, Weilheim, Deutschland) kalibriert.

**Ammonium-Stickstoff ( $NH_4-N$ )**

In Anlehnung an ISO 5664 (1984) wurden unter alkalischen Bedingungen Aliquote von 1 bis 4 g der homogenisierten Exkrement- oder Gülle-Probe destilliert (Distillation Unit 323, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland). Das Messprinzip beruht darauf, dass das in den Proben enthaltene Ammonium durch Zugabe von 15 mL demineralisiertem



Wasser und 30 mL Natronlauge in Ammoniak umgesetzt und mittels Wasserdampfdestillation über 10 Minuten in eine Vorlage mit 50 mL Borsäure ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) und einem Indikator (200  $\mu\text{L}$  Mischindikator 5, Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt wird. Durch die Rücktitration mit 0.1 M Salzsäure bis zum Farbumschlag des Indikators von grün nach grau kann der Ammonium-Stickstoff-Gehalt quantitativ bestimmt werden. Der Ammonium-Stickstoff-Gehalt wurde in  $\text{g NH}_4\text{-N kg}^{-1}$  Frischgewicht angegeben und auf eine Dezimalstelle gerundet. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{NH}_4\text{-N} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c \cdot M_N}{m}$$

$V_1$ : Volumen der für die Titration benötigten Salzsäure [mL]  
 $V_0$ : Volumen der für die Titration der Blindprobe benötigten Salzsäure [mL]  
 $c$ : Konzentration der Salzsäure [M]  
 $M_N$ : Molare Masse des Stickstoffs [ $14.01 \text{ g mol}^{-1}$ ]  
 $m$ : Masse der Exkrement- oder Gülle-Probe [g]

Zur Qualitätssicherung wurde nach jeder Messreihe ein Ammoniumsulfat-Standard nach Probenaufstockung gemessen, wobei Wiederfindungsraten von 90 bis 110 % akzeptiert wurden. Andernfalls wurden die Daten nicht in die Auswertung einbezogen und die Messung wiederholt.

Für die Herstellung des Ammonium-Sulfat-Standards wurden 2.358 g Ammonium-Sulfat (bei  $105^\circ\text{C}$  getrocknet) (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 50 mL Reinstwasser gelöst (entspricht  $10 \text{ mg N mL}^{-1}$ ). Zur Probenaufstockung wurden 1 bis 4 g der Analysenprobe eingewogen und 1 mL des Ammonium-Sulfat-Standards zugegeben. Die Destillation erfolgte wie oben beschrieben. Die Wiederfindungsrate des Standards wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{WRF} = \frac{(V_2 - 7.15 - V_0) \cdot 100\%}{m_2} \cdot \frac{m_1}{(V_1 - V_0)}$$

WFR: Wiederfindungsrate [%]  
 $V_0$ : Volumen der für die Titration der Blindprobe benötigten Salzsäure [mL]  
 $V_1$ : Volumen der für die Titration der Probe ohne Standard benötigten Salzsäure [mL]  
 $V_2$ : Volumen der für die Titration der Probe mit Standard benötigten Salzsäure [mL]  
 $m_1$ : Masse der Exkrement- oder Gülle-Probe ohne Standard [g]  
 $m_2$ : Masse der Exkrement- oder Gülle-Probe mit Standard [g]  
7.15: Volumen der für die Titration von 10 mg Stickstoff benötigten Salzsäure [mL]

### Gesamt-Stickstoff ( $N_{\text{total}}$ )

Für die Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs mittels Kjeldahl-Aufschluss in Anlehnung an DIN ISO 11261 (1997) wurden 1 bis 4 g-Aliquote der homogenisierten Exkrement- oder

Gülle-Probe in Aufschlusskolben (500 mL, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) eingewogen. Der Aufschluss erfolgte unter Zugabe von je 10 mL konzentrierter Schwefelsäure, einer Kjeldahl-Katalysator-Tablette (Missouri-Katalysator, 5 g, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Siedesteinen über 2 h nach einer einstündigen Aufheizphase mittels Digestion Unit 430 (Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland). Durch den Aufschluss werden die in der Probe enthaltenen stickstoffhaltigen Verbindungen in Ammonium-Stickstoff überführt. Die Bestimmung des damit als Ammonium vorliegenden Gesamt-Stickstoffs wurde wie für die Ammoniumbestimmung beschrieben unter Zugabe von 30 mL demineralisiertem Wasser und 70 mL Natronlauge durchgeführt. Der Gesamt-Stickstoff-Gehalt wurde in  $\text{g N}_{\text{total}} \text{ kg}^{-1}$  Frischgewicht angegeben und auf eine Dezimalstelle gerundet. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$N_{\text{total}} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c \cdot M_N}{m}$$

- $V_1$ : Volumen der für die Titration benötigten Salzsäure [mL]  
 $V_0$ : Volumen der für die Titration der Blindprobe benötigten Salzsäure [mL]  
 $c$ : Konzentration der Salzsäure [M]  
 $M_N$ : Molare Masse des Stickstoffs [ $14.01 \text{ g mol}^{-1}$ ]  
 $m$ : Masse der Exkrement- oder Gülle-Probe [g]

Zur Qualitätssicherung wurde regelmäßig ein Phenylalanin-Standard nach Probenaufstockung gemessen. Für die Probenaufstockung wurden 1 bis 4 g der Analysenprobe eingewogen und 100 g Phenylalanin (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben (entspricht 8.48 mg N). Der Aufschluss und die Destillation erfolgte wie oben beschrieben. Die Wiederfindungsrate des Standards wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\text{WRF} = \frac{(V_2 - 6.05 - V_0) \cdot 100\%}{m_2} \cdot \frac{m_1}{(V_1 - V_0)}$$

- WFR: Wiederfindungsrate [%]  
 $V_0$ : Volumen der für die Titration der Blindprobe benötigten Salzsäure [mL]  
 $V_1$ : Volumen der für die Titration der Probe ohne Standard benötigten Salzsäure [mL]  
 $V_2$ : Volumen der für die Titration der Probe mit Standard benötigten Salzsäure [mL]  
 $m_1$ : Masse der Exkrement- oder Gülle-Probe ohne Standard [g]  
 $m_2$ : Masse der Exkrement- oder Gülle-Probe mit Standard [g]  
 7.05: Volumen der für die Titration von 8.48 mg Stickstoff benötigten Salzsäure [mL]

### Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB<sub>5</sub>)

Die Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs über 5 Tage erfolgte in Anlehnung an DIN EN 1899-1 (1998) mittels elektrochemischer Messung des gelösten Sauerstoffs in

der verdünnten Probe nach Allylthioharnstoffzugabe (Oxi 340i mit OxiCell 325 Sauerstoffelektrode, WTW, Weilheim, Deutschland). Die Exkrement- oder Gülle-Proben wurden wie in **Tab. 7** angegeben mit Leitungswasser verdünnt. Nach Zugabe von  $2 \text{ mg L}^{-1}$  Allylthioharnstofflösung zur Hemmung der Nitrifikation wurden die verdünnten Proben in luftdichte Flaschen gefüllt (Karlsruher Flaschen, 250 mL, Schott, Mainz, Deutschland) und diese 5 Tage bei  $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurde eine Blindprobe ohne Zugabe von Exkrement- oder Gülle-Proben inkubiert. Der  $\text{BSB}_5$  wurde aus der Differenz zwischen dem Sauerstoff-Gehalt zu Beginn und nach Beendigung der Inkubation, unter Berücksichtigung des Blindwertes, nach folgender Formel berechnet:

$$\text{BSB}_5 = \left[ (c_1 - c_2) - \frac{(V_t - V_e)}{V_t} \cdot (c_3 - c_4) \right] \cdot \frac{V_t}{V_e}$$

- $c_1$ : Sauerstoffkonzentration in der Probenlösung zur Zeit Null [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]  
 $c_2$ : Sauerstoffkonzentration in der Probenlösung nach 5 Tagen [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]  
 $c_3$ : Sauerstoffkonzentration in der Blindprobe zur Zeit Null [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]  
 $c_4$ : Sauerstoffkonzentration in der Blindprobe nach 5 Tagen [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]  
 $V_t$ : Gesamtvolumen der verdünnten Probe [mL]  
 $V_e$ : Volumen der Exkrement- oder Gülle-Probe [mL]

Die Angabe des  $\text{BSB}_5$  erfolgte in  $\text{g kg}^{-1}$  Frischgewicht. Werte unter  $1 \text{ g kg}^{-1}$  wurden mit 2 Dezimalstellen angegeben, Werte zwischen  $1 \text{ g kg}^{-1}$  und  $10 \text{ g kg}^{-1}$  mit einer Dezimalstelle. Die Angaben von Werten  $> 10 \text{ g kg}^{-1}$  erfolgte ohne Angabe der Dezimalstellen. Sauerstoffkonzentrationen in den Probenlösungen  $< 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1}$  konnten aufgrund der Messgenauigkeit der Sauerstoffelektrode nicht zur Berechnung des biologischen Sauerstoffbedarfs herangezogen werden. Vor jeder Messung wurde die Elektrode mittels Kalibriergefäß OxiCal-SL (WTW, Weilheim, Deutschland) kalibriert.

**Tab. 7: Verdünnungsfaktoren für die Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfes**

Exkrement oder Gülle	Verdünnungsfaktor
Rind $\geq 15 \text{ \% TS}$	1:4000
Rind $< 15 \text{ \% TS}$	1:2000
Schwein $\geq 10 \text{ \% TS}$	1:4000
Schwein $< 10 \text{ \% TS}$	1:2000

TS: Trockensubstanz

### Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Der chemische Sauerstoffbedarf der Exkrement- oder Gülle-Probe wurde mittels Küvettentest in Anlehnung an DIN ISO 15705 (2003) bestimmt (Küvettentest LCI 400, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Hierzu wurden die Proben, wie in **Tab. 8** angegeben, mit Reinstwasser verdünnt und anschließend jeweils Aliquote von 2 mL in eine kommerziell erhältliche Testküvette überführt. Während des Aufschlusses bei 148 °C über 120 Minuten (Thermoblock TR 205, Merck, Darmstadt, Deutschland) reagieren die in der Probe enthaltenen oxidierbaren Substanzen mit schwefelsaurer Kaliumdichromatlösung in Anwesenheit von Silbersulfat als Katalysator. Gleichzeitig erfolgt die Reduktion von  $\text{Cr}^{6+}$  (orange) zu  $\text{Cr}^{3+}$  (grün). Die Extinktion der grüngefärbten  $\text{Cr}^{3+}$ -Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 605 \text{ nm}$  bestimmt (Spektral-Photometer Cadas 100, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Der CSB wurde nach folgender Formel berechnet und in  $\text{g kg}^{-1}$  Frischgewicht ohne Dezimalstellen angegeben:

$$\text{CSB} = \frac{c \cdot f}{1000}$$

c: Chemischer Sauerstoffbedarf in der verdünnten Probenlösung [ $\text{mg L}^{-1}$  oder  $\text{mg kg}^{-1}$ ]

f: Verdünnungsfaktor

1000: Umrechnungsfaktor auf 1 kg Exkrement oder Gülle

**Tab. 8: Verdünnungsfaktoren für die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfes**

Exkrement oder Gülle	Verdünnungsfaktor
Rind > 15 % TS	1:200
Rind 5-10 % TS	1:100
Rind < 5 % TS	1: 50
Schwein > 10 % TS	1:250
Schwein > 5-10 % TS	1:200
Schwein 2.5-5 % TS	1:100
Schwein < 2.5 % TS	1: 50

Zur Qualitätssicherung wurde die Wiederfindungsrate eines Kaliumhydrogenphthalat-Standards nach DIN 38409-41 (1980) mittels Küvettentest bestimmt. Zur Herstellung der Standardlösung wurden 170.1 mg Kaliumhydrogenphthalat (für 2 Stunden bei 105 °C

getrocknet) in Reinstwasser gelöst. Nach Zugabe von 5 mL konzentrierter Schwefelsäure wurde der Standard auf 1 L mit Reinstwasser aufgefüllt. Der theoretische chemische Sauerstoffbedarf liegt laut DIN-Norm bei 200 mg L<sup>-1</sup>. Die Messung der Standard-Lösung erfolgte wie oben beschrieben. Zusätzlich zur Messung des reinen Standards erfolgte eine Standard-Messung nach Probenaufstockung. Hierzu wurde die Probe nach den in **Tab. 8** angegebenen Verdünnungsfaktoren an Stelle von Reinstwasser mit der oben beschriebenen Standard-Lösung verdünnt. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{WFR} = \frac{(c_1 - c_2) \cdot 100 \%}{200}$$

C<sub>1</sub>: CSB der Exkrement- oder Gülle-Probe mit Standard [mg kg<sup>-1</sup>]  
 C<sub>2</sub>: CSB der Exkrement- oder Gülle-Probe ohne Standard [mg kg<sup>-1</sup>]  
 200: theoretischer CSB des Kaliumhydrogenphthalat-Standards

Zusätzlich wurde in einem Vorversuch die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs mittels Kuvettentest (DIN ISO 15705; 2003) mit dem Aufschlussverfahren nach DIN 38409-41 (1980) verglichen.

Für das Aufschlussverfahren nach DIN 38409-41 (1980) wurden 20 mL der verdünnten Probe (**Tab. 8**) in Schliffgefäße pipettiert und 10 mL Quecksilber(II)-sulfat (80 g L<sup>-1</sup>) in schwefelsaurer Kaliumdichromatlösung als Oxidationsmittel, 30 mL Silbersulfatlösung (10 g L<sup>-1</sup> in Schwefelsäure) als Katalysator (beides Merck, Darmstadt, Deutschland) und jeweils 3 Siedeperlen zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in einer Rückflusseinrichtung mit Heizvorrichtung (CSB-Aufschlusseinheiten PA-CSB mit Behrotest Temperatur und Zeitsteuergerät TRS 200, Behr Labor Technik GmbH, Düsseldorf, Germany) bei 148 °C für 120 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Anteil der während der Oxidation nicht verbrauchten Kaliumdichromat-Ionen durch Rücktitration mit einer Ammonium Eisen(II)sulfat-Lösung und Ferroin als Indikator bestimmt. Zusätzlich wurde eine Blindwertbestimmung ohne Probenzugabe durchgeführt. Die Berechnung des chemischen Sauerstoffbedarfs erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{CSB} = \frac{c_A \cdot f}{V_P} \cdot (V_B - V_E)$$

c<sub>A</sub>: Stoffmengenkonzentration der Ammonium Eisen(II)sulfat-Lösung [M]  
 f: Äquivalenzfaktor 8000 mg mol<sup>-1</sup>  
 V<sub>P</sub>: Probenvolumen [mL]  
 V<sub>B</sub>: Zur Blindwertbestimmung verbrauchte Ammonium Eisen(II)sulfat-Lösung [mL]  
 V<sub>E</sub>: Verbrauchte Ammonium Eisen(II)sulfat-Lösung [mL]

### 3.1.3 Konditionierung und Lagerung der Exkreme

Direkt nach der Ausscheidung unterliegen Exkreme schnellen Veränderungen in ihrer Zusammensetzung durch die Umsetzung leicht verfügbarer organischer Komponenten, wie z.B. Harnstoff (Baader et al., 1977; Hoffmann und Hege, 1991; Hüther, 1999). Da dieser Effekt die Heterogenität der für die Herstellung von Referenzgülle verwendeten Exkreme erhöhen würde, wurden die Exkreme bis zum Abschluss der schnellen Umsetzungsprozesse einer Lagerung in 20 L-Gebinden bei Raumtemperatur unterzogen. Diese Phase wurde als Konditionierung bezeichnet.

Die Überprüfung der Konditionierungsphase erfolgte jeweils mittels 2 Rinderexkrementen (RE-4 und RE-5) und 2 Schweineexkrementen (SE-4 und SE-5). Die Exkreme wurden hierzu in den 20 L-Gebinden gelagert und täglich mittels eines Farbrührers und einer handelsüblichen Bohrmaschine (z.B. PSB 500 RE, Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland) homogenisiert. Alle 2 bis 7 Tage wurden Aliquote der Exkreme entnommen und einer umfassenden Matrixcharakterisierung unterzogen. Die Konditionierungsphase wurde nach Erreichen konstant anaerober Bedingungen, gemessen an einem Redoxpotential  $< +150$  mV und einem Sauerstoff-Gehalt  $< 0.1$  mg kg<sup>-1</sup>, und einem weitgehend stabilen Ammonium-Stickstoff-Gehalt abgeschlossen. Nach Abschluss der Konditionierungsphase wurden die Exkreme in Aliquoten von 1 bis 2 Liter in handelsüblichen Gefrierboxen bei  $-20$  °C gelagert bzw. direkt zur Herstellung der Referenzgülle verwendet. Alle anderen Exkreme wurden in gleicher Weise konditioniert, wobei hier keine regelmäßige Charakterisierung erfolgte.

Um die möglichen Veränderungen der Exkreme während der Lagerung bei  $-20$  °C aufzunehmen, wurden exemplarisch Aliquote des Rinderexkremes RE-1 und des Schweineexkremes SE-1 in unregelmäßigen Abständen bis zu 378 Tagen bzw. 322 Tagen aufgetaut und nach einer Adaptationsphase von 3 Tagen bei Raumtemperatur umfassend charakterisiert.

### 3.1.4 Herstellung von Referenzgülle

Basis für die Referenzgülleproben bilden die konditionierten und charakterisierten Exkreme. Die bei  $-20$  °C gelagerten Exkreme wurden für drei Tage bei Raumtemperatur aufgetaut, um die enthaltenen Mikroorganismen zu remobilisieren. Die Herstellung der Referenzgülle erfolgte durch Einstellung der Exkreme auf einen bestimmten

Trockensubstanzgehalt durch die Zugabe von Trinkwasser. Die Rindergülle wurde auf einen Trockensubstanzgehalt von 10 %, die Schweinegülle auf 5 % Trockensubstanzgehalt eingestellt. Vor der Herstellung von Referenzgülle wurde der Trockensubstanzgehalt der Exkreme wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben bestimmt. Die Berechnung der Exkrement- und Wassereinwaage erfolgte nach folgender Formel:

$$m_{\text{Ex}} = \frac{TS_{\text{G}} \cdot m_{\text{G}}}{TS_{\text{Ex}}} \qquad m_{\text{W}} = m_{\text{G}} - m_{\text{Ex}}$$

$m_{\text{Ex}}$ : Menge an benötigtem Exkrement [g]  
 $TS_{\text{G}}$ : gewünschte Trockensubstanz der Gülle [%]  
 $m_{\text{G}}$ : gewünschter Menge der Gülle [g]  
 $TS_{\text{Ex}}$ : Trockensubstanz des Exkreme [%]  
 $m_{\text{W}}$ : Menge an benötigtem Wasser [mL]

Die Einwaage der Exkreme erfolgte für die Stabilitätstests direkt in die Labortestsysteme oder für die Charakterisierung der Matrix in ein Braunglasvial entsprechender Größe. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Trinkwasser wurde die Gülle mit einem Rührstab oder Löffel homogenisiert. Anschließend wurde die hergestellte Gülle umfassend charakterisiert.

### 3.1.5 Interner Ringversuch zur Matrixcharakterisierung von Exkrement- und Gülleproben

Die Validität der Methoden zur Herstellung und Charakterisierung von Referenzgülle wurde anhand eines laborinternen Ringtests mit 4 Teilnehmern, welche über unterschiedliche Erfahrungen in der analytischen Chemie verfügten, überprüft. Untersucht wurden ein Rinderexkrement (RE) und ein Schweineexkrement (SE) sowie die daraus hergestellten Referenzgülleproben. Die Referenzgülle mit einem Trockensubstanzgehalt von 10 % für Rindergülle (RG) bzw. 5 % für Schweinegülle (SG) wurde von den Teilnehmern wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben hergestellt. Sowohl die Exkreme als auch die Gülle wurden anhand der folgenden, der in Kapitel 3.1.2 aufgeführten, Parameter untersucht: Trockensubstanz (TS), mineralischer Gehalt ( $R_{\text{min}}$ ), organischer Gesamt-Kohlenstoff (TOC), pH-Wert, Redox-Potential (Eh), gelöster Sauerstoff ( $O_2$ ), Ammonium-Stickstoff ( $NH_4\text{-N}$ ), Gesamt-Stickstoff ( $N_{\text{total}}$ ), biologischer Sauerstoffbedarf ( $BSB_5$ ) und chemischer Sauerstoffbedarf (CSB).

### **3.2 Auswahl der eingesetzten Sulfonamide**

Die experimentelle Entwicklung von Methoden zum Test von Tierarzneimitteln in Gülle beruht auf einer Betrachtung des Rückstandsverhaltens der Substanzen im Stabilitätstest. Für eine vollständige Bilanzierung unter Berücksichtigung der Mineralisation, der extrahierbaren sowie der nicht-extrahierbaren Rückstände war hier der Einsatz der Radiotraceranalytik notwendig. Dieses Verfahren bietet gegenüber rückstandsanalytischen Untersuchungen den Vorteil, dass neben der Konzentrationsabnahme der applizierten Testsubstanz auch die Mineralisation sowie die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in die Betrachtung einbezogen werden können.

Die Konzentration des eingesetzten Radiotracers orientiert sich an der Expositionsabschätzung der Substanz in der Gülle sowie an der analytischen Praktikabilität. Diese ist abhängig von der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten Radiotracers. So ist eine ausreichende Radioaktivitätskonzentration in der Gülle Voraussetzung für die Durchführbarkeit eines Metabolenscreenings. Die in dieser Arbeit durchgeführten ersten Schritte zur Methodenentwicklung für die Durchführung von Stabilitätstests von Tierarzneimitteln in Gülle konzentrierten sich auf 3 Testsubstanzen aus der Stoffklasse der Sulfonamide.

#### **3.2.1 Pharmakologie der Sulfonamide**

Sulfonamide gehören zur Klasse der Breitbandantibiotika. Sie werden in der Veterinärmedizin zur Prävention und Behandlung bakterieller Infektionen in landwirtschaftlichen Viehbeständen in verschiedenen Kombinationen bei Atemwegs-, Magen-Darm- und Harnwegserkrankungen angewendet (Boxall et al., 2004; Löscher et al., 2003). Sulfonamide sind synthetische Derivate des Sulfanilamids, wobei durch unterschiedliche Substitution am Stickstoff der Sulfonamidgruppe verschiedene Derivate mit unterschiedlicher Löslichkeit, Proteinbindung, Gewebeverteilung, Metabolisierungs- und Eliminationsraten entstehen.

Die Wirkungsweise von Sulfonamiden beruht auf der Hemmung der Folsäuresynthese. Folsäure dient als wichtiger Baustein der bakteriellen DNA, RNA und Eiweißsynthese. Nach einer Latenzzeit von 4 - 6 Stunden wird im Organismus ein bakteriostatischer Effekt erreicht, welcher dem befallenen Organismus einen Abbau der Bakterien ermöglicht (Löscher et al., 2003). Der Säugetierorganismus selbst ist von dieser Wirkung nicht betroffen, da er keine Folsäure synthetisieren kann, sondern diese aus der Nahrung aufnimmt. Die Ausscheidung der Sulfonamide erfolgt größtenteils in unveränderter, also



chemotherapeutisch aktiver Form nach unterschiedlichen Halbwertszeiten. Diese liegen nach Löscher et al. (2003) für Sulfamethoxazol bei 2 bis 11 Stunden (Rind) bzw. 3 Stunden (Schwein) und für Sulfadiazin bei 3 bis 7 Stunden (Rind) bzw. 8 Stunden (Schwein). Ein Teil der Sulfonamide wird zudem in Form des in der Leber acetylierten Phase II-Metaboliten ausgeschieden (Boxall et al., 2002; Halling-Sørensen et al., 1998; Löscher et al., 2003; Thiele-Bruhn, 2003). Dieser wird jedoch in der Galle wieder in die therapeutisch aktive Ausgangsform umgewandelt (Berger, et al., 1986; Grote, 2005; Hölte und Kreuzig, 2007; Langhammer, 1989).

In diversen Screening-Untersuchungen zum Vorkommen von Sulfonamiden in Galle konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen zu unterschiedlichen Konzentrationen in der Galle enthalten sein können (siehe **Tab 1**, Seite 3). Die ausgeschiedene Menge hängt unter anderem von der Spezies, Dosis, dem Wirkstoff und der Applikationsform ab (Haller et al., 2002; Kümmerer et al., 2000).

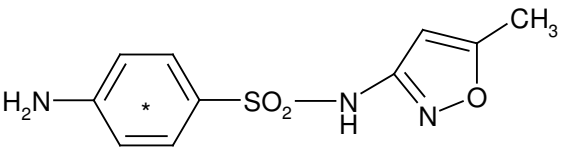
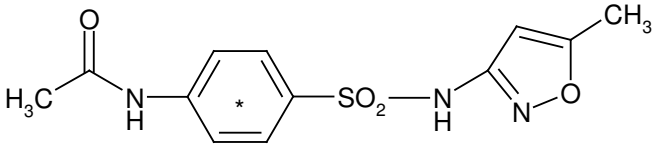
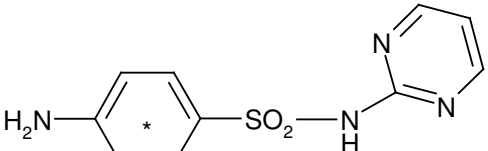
### 3.2.2 Eingesetzte Radiotracer

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Sulfonamide Sulfamethoxazol, dessen korrespondierender Hauptmetabolit Acetyl-Sulfamethoxazol (beide Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland) sowie Sulfadiazin (Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig, Deutschland) eingesetzt. Alle Substanzen standen als phenylring-markierte Radiotracer zur Verfügung (**Tab. 9**).

Für die Stabilitätstests wurden jeweils 50 µL der in **Tab. 10** angegebenen <sup>14</sup>C-Sulfonamid-Standardlösung zu 100 g Galle dotiert. Alle Standards waren in unterschiedlichen Konzentrationen in Acetonitril gelöst. Die eingesetzte Radioaktivitätsmenge lag zwischen 32650 und 71000 Bq je 100 g Galle. Die eingesetzte Konzentration von 220 bis 1210 µg Sulfonamid kg<sup>-1</sup> Galle ergab sich aus der spezifischen Aktivität der eingesetzten Radiotracer. Alle Substanzen lagen mit einer radiochemischen Reinheit von 94 und 100 % vor, welche, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, bestimmt wurde.

Die Stabilitätstests mit <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol wurden 2005 und 2006 durchgeführt. Da im Jahr 2006 zusätzlich ein Metaboliten-Screening der Extrakte erfolgte, wurde die Konzentration der eingesetzten Standardlösung von 560 µg kg<sup>-1</sup> auf 1250 µg kg<sup>-1</sup> erhöht.

Tab. 9: Im Stabilitätstest verwendete Sulfonamide

Testsubstanz	Strukturformel
<b>Sulfamethoxazol (SMZ)</b> $N^1$ -(5-Methyl-3-Isoxazolyl)-Sulfanilamid	 [Phenylring-U- $^{14}\text{C}$ ]-Sulfamethoxazol
<b>Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ)</b> $N^4$ -(3-Acetyl-)- $N^1$ -(5-Methyl-3-Isoxazolyl)-Sulfanilamid	 [Phenylring-U- $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-Sulfamethoxazol
<b>Sulfadiazin (SDZ)</b> $N^1$ -(2-Pyrimidinyl)-Sulfanilamid	 [Phenylring-U- $^{14}\text{C}$ ]-Sulfadiazin

Tab. 10: Eingesetzte  $^{14}\text{C}$ -Radiotracer-Standardlösungen

Wirkstoff	spezifische Radioaktivität [MBq mmol $^{-1}$ ]	Reinheit [%]	Radioakt.-Konzentration [Bq $\mu\text{L}^{-1}$ ]	Standard-Konzentration [ $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ]	eingesetzte Konzentration [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]
$^{14}\text{C}$ -SMZ	148	98	650	1.1	560
$^{14}\text{C}$ -SMZ *	148	98	1470	2.5	1250
$^{14}\text{C}$ -A-SMZ	148	100	1380	2.8	1380
$^{14}\text{C}$ -SDZ	814	94	1420	0.4	220

\* dieser Standard wurde in die 2006 durchgeführten Stabilitätstests eingesetzt

### 3.2.3 Bestimmung der radiochemischen Reinheit

Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit erfolgte mittels einer dünnsschicht-chromatographischen Auftrennung (thin layer chromatography = TLC) und einer anschließende Messung der Radioaktivitätsverteilung mittels TLC-Linear-Analyser.

#### Prinzip der Radio-Dünnsschichtchromatographie (RTLC):

Der TLC-Linear-Analyser (Tracemaster 20 Automatic TLC-Linear-Analyser B 284, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) erfasst die Verteilung der Radioaktivität auf einer Dünnsschichtplatte. Jeweils eine Spur auf der Platte wird mittels eines ortsempfindlichen Zählrohrs parallel zur Laufstrecke gemessen. Dieses enthält einen positiv geladenen Zählendraht (Anode) sowie eine Kathode und wird konstant von einem Zählgas (90 % Argon, 10 % Methan) durchflossen. Die radioaktiven Substanzen emittieren  $\beta$ -Teilchen, welche durch eine Blende in das Zählrohr gelangen und dort Argon-Atome ionisieren. Durch Anregung der freigesetzten Elektronen durch die Anode können diese weitere Argon-Atome ionisieren. So kommt es an entsprechender Stelle zu einer kaskadenartigen Ladungsverstärkung, welche an der jeweiligen Stelle des Zählrohrs detektiert wird. Die Angabe der Radioaktivitätsverteilung erfolgt in Impulsen ohne die Angabe einer Zeiteinheit, da die Messzeit von der Menge der aufgetragenen Aktivität abhängt. Die Identifizierung der Substanz erfolgt über einen Rf-Wert-Vergleich mit einem gleichzeitig gemessenen Standard.

Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurden 3 bis 10  $\mu\text{L}$  der Standardlösungen (ca. 1000 Bq) auf eine Kieselgelplatte (60F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm<sup>2</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen und in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten Trogkammer (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) entwickelt. Als Laufmittel wurden 100 mL Ethylacetat je Platte verwendet. Die Ergebnisse wurden anhand eines zweiten Laufmittels, einem Gemisch aus Chloroform und Butanol (8:1), überprüft (Garcia et al., 1998).

### 3.2.4 Unmarkierte Testsubstanzen

Um die Veränderungen in der Güllematrix während der Inkubationsperiode aufzeigen zu können, wurden parallel zu jedem Stabilitätstest Matrixcharakterisierungstests mit unmarkierten Testsubstanzen durchgeführt. Hierzu wurden unmarkierte Referenzsub-

stanzen entsprechend der Radiotracer-Standardlösungen in gleicher Konzentration in Acetonitril gelöst und jeweils 50 µL zu 100 g Gülle dotiert. Die Referenzsubstanzen Sulfamethoxazol sowie Sulfadiazin wurden von Riedel-de Haën® (Honeywell Special Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland) bezogen.

Das Acetyl-Sulfamethoxazol wurde nach Langhammer (1989) aus dem Sulfamethoxazol synthetisiert. Hierzu wurden 10 g Sulfamethoxazol in 250 mL wasserfreiem Aceton gelöst und nach Zugabe von 6.3 g Kaliumcarbonat wurde langsam mittels Tropftrichter 7.05 g destilliertes Acetylchlorid zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz über einen Büchnertrichter abfiltriert und der Filtrationsrückstand mit Reinstwasser und anschließend mit Aceton (wasserfrei) gewaschen. Die Ausbeute betrug 6.34 g. Die Identifizierung der Substanz erfolgte mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Schmelzpunktbestimmung.

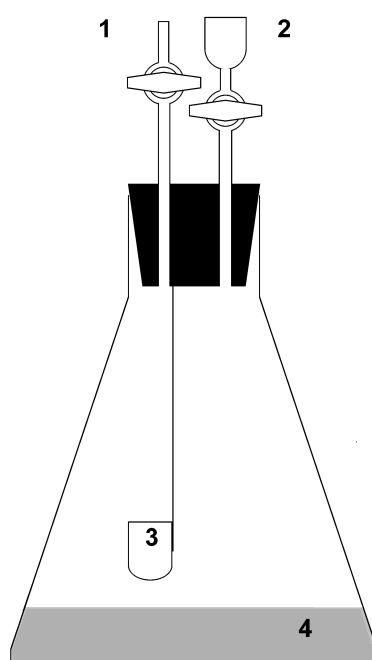
### 3.3 Durchführung der Stabilitätstests

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Stabilitätstests von Tierarzneimitteln in Gülle eine geschlossene Batch-Apparatur verwendet, welche einen diskontinuierlichen Gasaustausch ermöglicht. Aus Gründen der Qualitätssicherung wurden zusätzliche Tests in der auf die OECD-Richtlinie 307 (2002) zurückgehenden Durchfluss-Apparatur durchgeführt.

#### 3.3.1 Batch-Apparatur

Die für die Stabilitätstests in Gülle verwendete Batch-Apparatur (**Abb. 4**) geht auf die OECD Richtlinie 304 A zurück. Aus Gründen der Praktikabilität wurde die dort vorgeschlagene externe Falle jedoch in den Kolben integriert (OECD, 1981). Für die Stabilitätstests wurden 100 g-Aliquote der Rinder- oder Schweinegülle mit 10 % bzw. 5 % Trockensubstanzgehalt in den 300 mL-Erlenmeyerkolben eingefüllt. Anschließend wurden jeweils 50 µL der Standardlösungen der Testsubstanzen zu den Referenzgülleproben dotiert und durch schwenken des Kolbens verteilt. Um ein Abdampfen des Lösungsmittels zu ermöglichen, wurde der Kolben bis zu 60 min Minuten offen stehen gelassen und anschließend mit einem Glasaufsatz verschlossen, welcher mit einem Einlass- und Auslassventil versehen war. Im Auslassventil befand sich ein Aktivkohlefilter. Die an dem Aufsatz befestigte, interne Falle wurde mit 8 mL einer 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung

befüllt (Kreuzig und Höltge, 2005), um das durch Mineralisation gebildete  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid zu absorbieren. Um anaerobe Milieubedingungen zu gewährleisten wurden die Kolben jeweils 5 Minuten im gelinden Stickstoffstrom gespült und anschließend verschlossen. Der Stickstoffaustausch sowie der Austausch der Kaliumhydroxid-Lösungen fand während der Inkubation im Abstand von 7 Tagen statt. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln bei  $20 \pm 2\text{ °C}$  für 0, 3, 7, 30, 72, 100 und 177 Tage. Die Inkubationszeit von 177 Tagen beruht auf der in der Düngeverordnung geforderten Lagerungskapazität für Gülle von 6 Monaten (Düngeverordnung, 2006). Am Ende der Inkubationsintervalle erfolgte die Bestimmung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückstände. Zur Qualitätssicherung wurden alle Ansätze in Doppelbestimmung durchgeführt.



1: Einlassventil, 2: Auslassventil mit Aktivkohlefilter, 3:  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Absorptionsfalle mit Kaliumhydroxid-Lösung (8 mL, 0.1 M), 4: Gülle

**Abb. 4: Batch-Apparatur für die Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -markierten Tierarzneimitteln in Gülle**

### Modifizierung der Testparameter

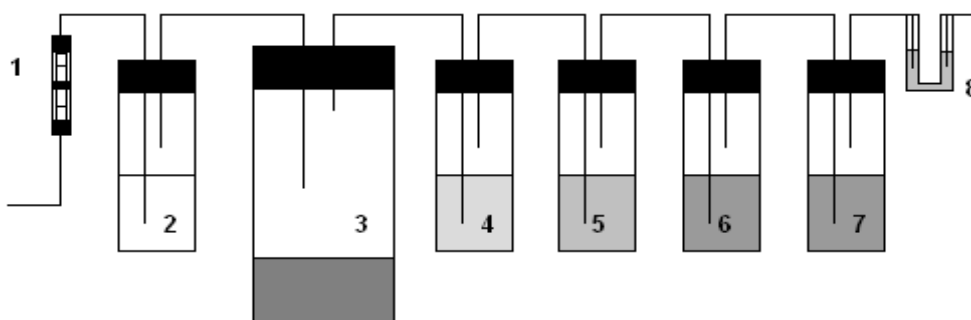
Um den Einfluss des Trockensubstanzgehalts auf die Stabilität von Sulfonamiden in Gülle einschätzen zu können, wurden unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol Kurzzeittests mit Inkubationsintervallen von 3, 7 und 30 Tagen mit unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten durchgeführt. Hierzu wurden sowohl Rinder- als auch Schweinegülle nach der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Vorgehensweise auf Trockensubstanzgehalte von 2.5, 5 und

10 % eingestellt und in gleicher Weise dotiert, inkubiert und analysiert wie für die Stabilitätstests beschrieben.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität von Sulfonamiden in Gülle betrachten zu können, wurden analog zur Modifizierung der Trockensubstanz Kurzzeittests von 3, 7 und 30 Tagen bei Inkubationstemperaturen von 5, 10 und 20 °C mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol durchgeführt. Die Ansätze mit Rindergülle (10 % TS) und Schweinegülle (5 % TS) wurden ebenfalls in gleicher Weise dotiert, inkubiert und extrahiert wie für die Stabilitätstests beschrieben.

### 3.3.2 Durchfluss-Apparatur

Für den Test der Bioverfügbarkeit von Chemikalien im Boden unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen wird in der OECD-Richtlinie 307 (2002) die Durchfluss-Apparatur vorgeschlagen. Das Prinzip dieser in **Abb. 5** dargestellten Apparatur beruht darauf, dass angefeuchtete Luft oder Stickstoff zur Einhaltung aerober bzw. anaerober Bedingungen kontinuierlich durch das Probengefäß geleitet wird. Für die Untersuchung unter anaeroben Bedingungen in Gülle wurde ein kontinuierlicher Stickstoffstrom von  $1.8 \text{ L min}^{-1}$  verwendet. Der Gasfluss wurde anschließend durch 4 Waschflaschen geleitet. Diese waren mit jeweils 30 mL Ethylenglykol zur Absorption flüchtiger organischer  $^{14}\text{C}$ -haltiger Substanzen (z.B. Methan), 30 mL Schwefelsäure (0.05 M) zur Absorption  $^{14}\text{C}$ -haltiger flüchtiger anorganischer Substanzen und 2 Fallen mit je 30 mL Kaliumhydroxid (2 M) zur Absorption von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid gefüllt.



1: Durchflussmesser, 2: Gasbefeuchtung, 3: Gülle, 4: Ethylenglykol (30 mL), 5: Schwefelsäure (30 mL, 0.05 M), 6, 7: Kaliumhydroxid-Lösung (30 mL, 2 M), 8: Blasenähler

**Abb. 5: Durchfluss-Apparatur für die Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -markierten Tierarzneimitteln in Gülle**

Analog zur Batch-Apparatur wurden jeweils 100 g der Rinder- oder Schweinegülle in die 500 mL-Probengefäße eingefüllt und mit jeweils 50 µL der zu untersuchenden Standardlösung, in diesem Fall  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin, dotiert. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C im Dunkeln für 7 Tage. Am Ende der Inkubationsintervalle erfolgte die Bestimmung der Mineralisation und flüchtiger  $^{14}\text{C}$ -haltiger Substanzen in den Waschflaschen sowie die Bestimmung der extrahierbaren und der nicht-extrahierbaren Rückstände. Zur Qualitätssicherung wurden alle Ansätze in Doppelbestimmung durchgeführt.

### **3.3.3 Matrixcharakterisierungstests**

Um die Veränderungen in der Güllematrix während der Inkubationsperiode aufzeigen zu können, wurden parallel zu jedem Inkubationsintervall jeweils 100 g Gülle mit jeweils 50 µL der entsprechenden unmarkierten Referenzsubstanz in gleicher Konzentration dotiert. Die Inkubation der Matrixcharakterisierungstests erfolgte in gleicher Weise wie für die Stabilitätstests beschrieben. Nach Ablauf des Inkubationsintervalls wurden die Güllematrizes in Braunglasvials überführt und einer umfassenden Charakterisierung unterzogen.

Parallel zu den ersten Stabilitätstests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle wurden 2 weitere Kontrollansätze zusätzlich inkubiert und die Gülle nach Abschluss der Inkubationsintervalle charakterisiert. Hierbei handelte es sich um undotierte Gülleproben ohne jeglichen Zusatz sowie Gülleproben, zu welchen jeweils 50 µL des Standard-Lösungsmittels Acetonitril dotiert wurde.

## **3.4 Bestimmung der Mineralisation**

Zur Bestimmung des durch den mikrobiellen Abbau während der Stabilitätstests freigesetzten  $^{14}\text{C}$ -Kohlendoxids wurden die 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösungen in den internen Fallen der Batch-Apparaturen alle 7 Tage nach Durchführung des Gasaustausches gewechselt. Die 8 mL-Aliquote wurden in 20 mL-Polyethylen-Vials überführt und mit 10 mL Quicksafe A (beides Zinsser, Frankfurt, Deutschland) versetzt. Die Messung der Mineralisation erfolgte mittels Flüssigszintillationszählung (LSC). Um Messfehler durch Lumineszenz der Kaliumhydroxid-Lösung in Verbindung mit dem Szintillationscocktail zu vermeiden, wurden die Vials vor der Messung 4 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Mineralisationsrate wurde aus der Summe der  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Gehalte in den Aliquoten einer Inkubationsperiode errechnet.

Die Bestimmung der Mineralisationsrate in der Durchfluss-Apparatur erfolgte wie oben beschrieben, wobei hier 10 mL-Aliquote der 2 M Kaliumhydroxidlösungen aus den Fallen mit jeweils 10 mL Quicksafe A versetzt wurden.

Die Angabe der Messergebnisse erfolgte für Werte  $> 1\%$  der applizierten Ausgangsaktivität ohne Dezimalstellen, für Werte ab  $0.1\%$  mit einer Dezimalstelle. Geringere Werte wurden als  $< 0.1\%$  angegeben, wobei die Nachweisgrenze bei 1.5 Bq und die Bestimmungsgrenze bei 30 Bq lag.

#### Prinzip der Flüssigszintillationsmessung:

Die Flüssigszintillationsmessung ist eine Methode zur Bestimmung von radioaktiven Verbindungen in flüssigen Medien (Stolz, 2005). Das Prinzip beruht auf der homogenen Verteilung der radioaktiven Substanz in einem Szintillations-Cocktail. Dieser besteht aus einem aromatischen Lösungsmittel sowie darin enthaltenen Szintillatoren. Durch die in Probenlösungen enthaltenen radioaktiv markierten Substanzen wird kinetische Energie auf die Szintillationsmoleküle übertragen, welche Photonen emittieren. Diese werden über 2 Photo-Multiplier-Systeme detektiert (Liquid Szintillation Counter (LSC) Tri-Carb® 2500 TR, Packard Instrument Company oder Wallac 1409 DSA Liquid Szintillation Counter, beide PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau).

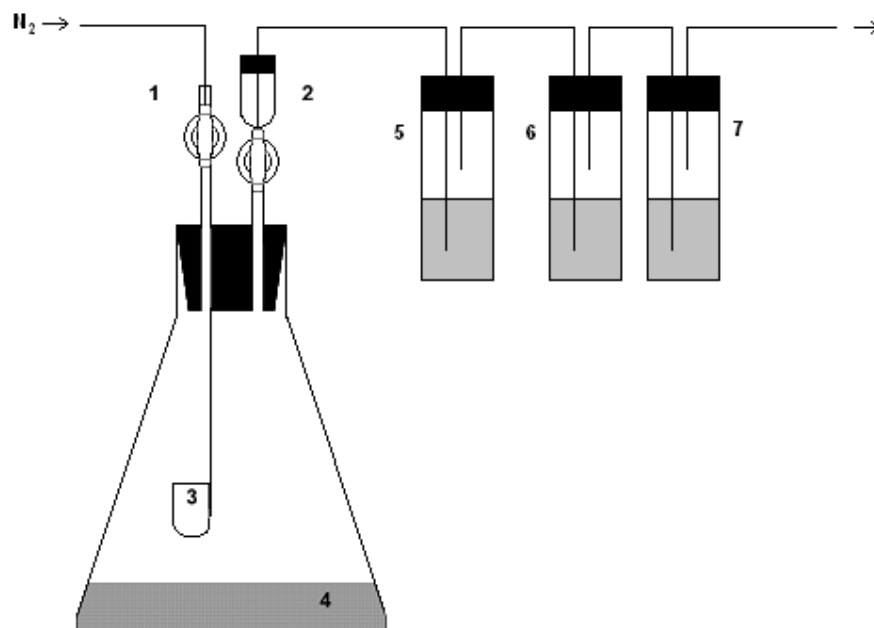
Während der Szintillationsmessung kann es zu verschiedenen Störungen kommen, so genannten Quencheffekten. So können Probenbestandteile selbst die durch die Radioaktivität emittierte Energie aufnehmen, bevor es zu einer Anregung der Szintillatoren kommt. Dieser Vorgang wird als chemischer Quench bezeichnet. Beim optischen Quench oder Farbquench kommt es zu einer Absorption von bereits gebildeten Photonen durch gefärbte Proben, wie z.B. Gülle-Extrakte. Dieser Quencheffekte kann vor der eigentlichen Messung unter Einsatz eines niederenergetischen  $\gamma$ -Strahlers ( $^{133}\text{Ba}$  bzw.  $^{152}\text{Eu}$ ) bestimmt und über einen Korrekturfaktor berücksichtigt werden (externes Quenching).

Für die Szintillationsmessung standen 2 Cocktails zur Verfügung, wobei der Cocktail Quicksafe A für wässrige Proben verwendet wurde. Zur Messung organischer Proben wurde Quicksafe N (beide Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) eingesetzt. Die Messungen erfolgte in 20 mL-Polyethylen-Vials (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) mit jeweils 10 mL des entsprechenden Cocktails. Je nach erwarteter Radioaktivität betrug die Messzeit 5 bis 30 Minuten.



### 3.4.1 Erfassung weiterer flüchtiger Bestandteile

In Anlehnung an die in der OECD-Richtlinie 307 (2002) vorgeschlagenen Durchfluss-Apparatur wurde die Batch-Apparatur so modifiziert, dass auch bei dem hier durchgeführten diskontinuierlichem Gasaustausch mögliche gasförmige oder volatile Verbindungen absorbiert werden konnten (**Abb. 6**). Hierzu wurde hinter dem Aktivkohlefilter in der Auslassöffnung eine Kaskade aus Polyethylen-Vials (20 mL, Zinsser, Frankfurt, Deutschland) geschaltet, welche analog zu der Durchfluss-Apparatur mit jeweils 10 mL Ethylenglykol und 10 mL Schwefelsäure (0,05 M) gefüllt waren. Die dritte Falle wurde an Stelle des für die Durchfluss-Apparatur vorgeschlagenen Kaliumhydroxids (2 M) mit einem Szintillationscocktail zur Erfassung von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid (Oxisolve C-400, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) gefüllt.



**1:** Einlassventil, **2:** Auslassventil mit Aktivkohlefilter, **3:**  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Absorptionsfalle mit Kaliumhydroxid-Lösung (8 mL, 0.1 M), **4:** Gülle, **5:** Ethylenglykol (10 mL), **6:** Schwefelsäure (10 mL, 0.05 M), **7:** Szintillationscocktail (10 mL)

**Abb. 6: Batch-Apparatur für die Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -markierten Tierarzneimitteln in Gülle mit Gasstripping-Vorrichtung**

Direkt vor dem Austausch der Kaliumhydroxid-Lösungen in der internen Falle wurde der Gasraum für 5 Minuten unter gelindem Stickstoffstrom gespült und das ausgetriebene Gas durch die Fallen geleitet. Anschließend wurde die Radioaktivität in den Absorptions-Lösungen unter Zugabe von 10 mL eines Szintillationscocktails (Quicksafe A, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Die Freisetzung gasförmiger oder weiterer flüchtiger Bestandteile wurde anhand der 177-Tage-Proben bzw. den 100-Tage-Proben der Stabilitätstests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol sowie  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin überprüft.

Die Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -haltigen, gasförmigen oder flüchtigen Substanzen aus den Fallen der Durchfluss-Apparatur erfolgte in Aliquoten von jeweils 10 mL des Ethylenglykols und der Schwefelsäure (0.06 M). Die Aliquote wurden mit jeweils 10 mL Quicksafe A versetzt und die Aktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

### **3.4.2 Vorversuch zur Freisetzung von $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid**

Um zu untersuchen, ob die Testsubstanzen in Gülle unter anaeroben Bedingungen  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid freisetzen, wurde ein Kurzzeittest mit einer Substanz durchgeführt, welche in Abbautests in Boden und Klärschlamm eine schnelle Mineralisation aufwies (Kreuzig et al., 2005).

Für den Stabilitätstest in Schweinegülle wurde das Analgetikum Ibuprofen (Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig, Deutschland) mit einer spezifischen Radioaktivität von  $2180 \text{ MBq mmol}^{-1}$  und einer Reinheit von 83 % ausgewählt. Analog zu den Langzeittests wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  der Standard-Lösung (0.03 MBq in 50  $\mu\text{L}$  Methanol entspricht  $33 \mu\text{g Ibuprofen kg}^{-1}$  Gülle) zu jeweils 100 g Schweinegülle dotiert. Die Inkubation erfolgte für 0, 3, 7 und 30 Tage bei 20 °C im Dunkeln. Die Bestimmung der Mineralisation erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben.

### 3.5 Extraktion von Sulfonamiden aus Gülle

Die Bestimmung der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Rückstände in der Gülle erfolgt durch Messung der Radioaktivität in Aliquoten der Extrakte mittels Flüssigszintillationsmessung (siehe Kapitel 3.4).

#### 3.5.1 Überprüfung von Ethylacetat als Lösungsmittel

Um die Eignung verschiedener Lösungsmittel als Extraktionsmittel für Gülle zu testen, wurden 100 g Gülle mit jeweils 150 mL eines Lösungsmittels versetzt und über Nacht bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Filtrieren der Überstände erfolgte die Aufkonzentrierung der Extrakte mittels Rotationsverdampfer. Bei den getesteten Lösungsmitteln handelte es sich neben Ethylacetat um Methanol, Methanol/Ethylacetat (1:1), Methanol/Cyclohexan (1:1), Aceton und Acetonitril.

Vor dem Einsatz von Ethylacetat als Extraktionsmittel für  $^{14}\text{C}$ -Sulfonamide aus Gülle wurden 100 g bzw. 50 g Gülle mit 50 bzw. 25  $\mu\text{L}$   $^{14}\text{C}$ -Sulfamthoxazol-Standard-Lösung mit einer Konzentration von 560  $\mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle dotiert, um die Extraktionseffizienz zu überprüfen. Direkt nach der Dotierung wurden die Proben mit 150 mL Ethylacetat versetzt, und über Nacht mittels Horizontalschüttler (Type 3020, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) bei 200 U/min geschüttelt. Nach der Extraktion wurde der Überstand durch einen mittelschnellen Faltenfilter (MN 615 1/4, Ø125 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) dekantiert. Der Extraktionsrückstand wurde dreimal mit jeweils 50 mL Ethylacetat versetzt und durch langsames umschwenken nachgespült und die Überstände ebenfalls durch den Faltenfilter dekantiert. Die Extrakte sowie die Spülfraktionen wurden vereinigt, das Gesamtvolumen bestimmt und zur Qualitätssicherung Aliquote mit unterschiedlichen Volumina (50 und 100  $\mu\text{L}$ ) für die Radioaktivitätsbestimmung mittels Flüssigszintillationsmessung entnommen. Hierfür wurden die Aliquote mit jeweils 10 mL Quicksafe N versetzt.

#### 3.5.2 Bestimmung der extrahierbaren Rückstände

Die Gülleproben aus den Stabilitätstests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfonamiden wurden nach Ende der Inkubationsintervalle mit je 150 mL Ethylacetat überschichtet und über Nacht bei 200 U  $\text{min}^{-1}$  auf dem Horizontalschüttler geschüttelt. Nach Ende der Extraktion wurde der

Überstand durch einen mittelschnellen Faltenfilter (MN 615 1/4, Ø125 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) dekantiert und der Extraktionsrückstand dreimal mit jeweils 50 mL Ethylacetat nachgespült. Nach Vereinigung der filtrierten Überstände wurde das Gesamtvolumen bestimmt, Aliquote (50 und 100 µL) mit jeweils 10 mL Quicksafe N versetzt und die enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung ermittelt. Anschließend wurden die Extrakte in Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer (Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) bei  $2.4 \times 10^4$  Pa und 40 °C auf Volumen von 5 mL (Rindergülle) bzw. 2 mL (Schweinegülle) aufkonzentriert. Die Extrakte wurden in Braunglasvials (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) überführt und bei 4-7 °C im Kühlschrank gelagert.

Zur weiteren Überprüfung der Extraktionseffizienz wurde bei ausgewählten 100-Tage-Proben bzw. 72-Tage-Proben aus den Stabilitätstests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol,  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin eine Nachextraktion mit salzsaurem Methanol durchgeführt. Hierzu wurden 20 g des getrockneten und homogenisierten Extraktionsrückstandes in einen 300 mL-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 150 mL Methanol sowie 600 µL konzentrierter Salzsäure versetzt. Die Extraktion erfolgte über Nacht bei 200 U min<sup>-1</sup>. Der Überstand wurde durch einen mittelschnellen Faltenfilter (MN 615 1/4, Ø150 mm, Macherey-Nagel GmbH) abfiltriert und der Extraktionsrückstand dreimal mit je 50 mL Methanol gespült. Aliquote von 50 und 100 µL des vereinigten Gesamtexttraktes wurden mit je 10 mL Quicksafe A versetzt und die Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung gemessen. Die Bestimmung der nicht-extrahierbaren Rückstände erfolgte nach Trocknung und Homogenisierung des Extraktionsrückstandes, wie in Kapitel 3.6 beschrieben.

### **3.5.3 Metaboliten-Screening**

Die aufkonzentrierten Extrakte wurden einem Metaboliten-Screening mittels Radio-Dünnschichtchromatographie unterzogen. Das Verfahren entsprach der Bestimmung der radiochemischen Reinheit (Kapitel 3.2.3), wobei hier je nach Radioaktivität 50 bis 120 µL der Extrakte auf die Kieselgelplatte aufgetragen wurde. Die aufkonzentrierten Rindergülle-Extrakte wurden vorher mikrofiltriert (Membranfilter Chromafil Typ 0-45-15 Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland). Ein Auftrag > 120 µL war aufgrund der hohen Matrixbelastung nicht möglich. In die Auswertung wurden Chromatogramme mit einer Impulszahl > 150 einbezogen. Eine entsprechende Radioaktivitätskonzentration

kann dieser Impulszahl nicht zugeordnet werden, da die Impulszahl neben der Konzentration durch Matrixeffekte sowie die Messzeit beeinflusst wird. Für Extrakte mit geringer Radioaktivität wurden maximale Messzeiten von 120 Minuten zugelassen.

Anhand der in den Extrakten enthaltenen Konzentration der unveränderten Ausgangsverbindung wurden sofern möglich die  $DT_{50}$ -Werte der Substanzen nach Timme et al. (1986) bestimmt.

### **3.6 Bestimmung der nicht-extrahierbaren Rückstände**

Die Bestimmung der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Rückstände in der Gülle erfolgte durch die vollständige Verbrennung von Aliquoten der extrahierten Gülleproben, Einleitung des  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxids in einen Szintillationscocktail und anschließender Messung der enthaltenen Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung.

Nach dem Dekantieren des Extraktionsmittels wurden die noch feuchten Extraktionsrückstände der Gülle in eine Abdampfschale überführt und mit 20 g Seesand (reinst) und 5 g Cellulose (Faserlänge 0.02 bis 0.1 mm) (beides Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Germany) vermischt. Die Rückstände wurden unter dem Abzug und anschließend im Exsikkator vollständig getrocknet. Die getrockneten Extraktionsrückstände der Gülle wurden mittels Mörser und Pistill homogenisiert und in Braunglasvials überführt. Bis zur Verbrennung wurden die Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Verbrennung erfolgte in Aliquoten von 100 bis 200 mg der getrockneten Gülleprobe.

#### Prinzip der Probenverbrennung:

Der Verbrennungsautomat (Biological Material Oxidizer OX-500, R. J. Harvey. Instrument Corporation, Hillsdale, NJ, USA) dient in Verbindung mit der Flüssigszintillationsmessung zur Detektion von radioaktiven Substanzen in festen Proben. Aliquote der Proben werden im Verbrennungsofen bei  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Sauerstoffstrom (380 mL/min) verbrannt. Durch die Verbrennung werden die in den Proben enthaltenen radioaktiven Verbindungen zu  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid oxidiert. Die Verbrennungsgase werden durch ein Katalysatorsystem geleitet (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland). Das gebildete  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid wird anschließend in 15 mL eines Szintillationscocktails (Oxisolve C-400, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) absorbiert und die enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt.

Zur Qualitätssicherung wurden jeweils 4 Aliquote einer Probe verbrannt. Bei Abweichungen  $> 20\%$  erfolgte eine weitere Verbrennung von 4 Aliquoten der Probe. Zur Kontrolle der Gerätefunktion wurde zu Beginn der Messung und nach jeder 4-fach Verbrennung eine Standard-Probe verbrannt und die Wiederfindungsrate bestimmt. Für die Standardprobe wurden 50  $\mu\text{L}$  eines  $^{14}\text{C}$ -Standards ( $\approx 80\text{ Bq}$ ) zu einer ebenfalls mit Cellulose und Seesand versetzten Gülleprobe ohne Radioaktivität dotiert. Die Wiederfindungsrate des Standards lag bei  $94 \pm 7\%$  ( $n=604$ ). Zudem wurde am Ende jeder Verbrennungsserie ein kommerzieller  $^{14}\text{C}$ -Papierstandard (Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) mit einer Aktivität von 83.3 Bq verbrannt und auch hier die Wiederfindungsrate bestimmt, welche bei  $96 \pm 8\%$  ( $n=50$ ) lag. Bei allen Standardmessungen wurden Wiederfindungsraten von 90-110 % akzeptiert. Um Verschleppungseffekte zu vermeiden, wurde nach jeder 4-fach Verbrennung und nach jedem Standard eine Leerverbrennung durchgeführt.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

Im folgenden Abschnitt wird auf die Herstellung von Referenzgülleproben mit reproduzierbarer Zusammensetzung für den Einsatz im Labortest eingegangen. Im Anschluss daran erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Stabilitätstests von Sulfamethoxazol, Acetyl-Sulfamethoxazol und Sulfadiazin unter Verwendung der umfassend charakterisierten Rinder- und Schweinegülle. Abschließend erfolgt die Bewertung des erarbeiteten Methodenkatalogs.

### **4.1 Eingesetzte Exkreme und Referenzgülleproben**

Für die Herstellung von Referenzgülle wurden Exkreme von Einzeltieren entnommen und diese nach einer Konditionierungsphase auf einen definierten Trockensubstanzgehalt eingestellt. Da Exkreme direkt nach der Ausscheidung schnell ablaufenden Ab- und Umbauprozessen unterliegen, diente die Konditionierungsphase dazu, die Variabilität der Exkreme vor der Herstellung von Referenzgülle möglichst weit einzuschränken. Die Dauer der Konditionierung wurde anhand von 2 Rinder- sowie 2 Schweineexkrementen überprüft. Nach Abschluss der Konditionierungsphase wurden die Exkreme direkt für die Herstellung der Referenzgülle verwendet bzw. für eine spätere Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Veränderung der Exkremenzusammensetzung während der Lagerung wurde mittels Matrixcharakterisierung in verschiedenen Zeitabständen an jeweils einem Rinder- sowie einem Schweinexkrement überprüft. In Kapitel 4.2.3 schließt sich ein Vergleich der verwendeten Exkreme und der daraus hergestellten Referenzgülle an.

#### **4.1.1 Konditionierung der Exkreme**

Zur Überprüfung der während der Konditionierungsphase ablaufenden Umsetzungsprozesse in Rinderexkrementen (RE) wurden die Exkreme RE-4 und RE-5 während der Lagerung bei Raumtemperatur in regelmäßigen Abständen charakterisiert. Die Konditionierungsphase wurde nach Erreichen konstant anaeroben Bedingungen und dem Erreichen eines stabilen Ammonium-Stickstoff-Gehalts, mit einer maximalen Abweichung von  $\pm 0.2 \text{ g kg}^{-1}$  an zwei aufeinander folgenden Messtagen, beendet. Das Redoxpotential sowie der gelöste Sauerstoff wurden als Indikatoren für die in den Exkrementen vorherrschenden Milieubedingungen herangezogen. Für das Redoxpotential wurde ein Schwel-

lenwert von  $< +150$  mV für anaerobe Milieubedingungen angenommen. Dieser Wert korrespondiert mit den Angaben von Ndegwa et al. (2003), wonach in Schweinegülle bei einem Redoxpotential  $< +150$  mV anaerobe Bedingungen herrschen. Nach Michels et al. (2000) werden in Gewässern anaerobe Bedingungen sogar bereits ab einem Redoxpotential von  $< +200$  mV angenommen. Das Redoxpotential der überprüften Rinderexkreme- mente variierte ab Tag 1 der Konditionierungsphase aufgrund der Heterogenität der Mat- rix zwischen  $-130$  mV und  $+40$  mV (**Tab. 11**).

Einen weiteren Indikator für die Milieubedingungen stellt der Gehalt an gelöstem Sauer- stoff ( $O_2$ ) dar. Nach Domsch (1992) kommen ab einem Sauerstoff-Gehalt von  $< 0.1$  mg  $kg^{-1}$  in flüssigen Medien keine aeroben Organismen mehr vor. Baader et al. (1977) weisen bereits bei einer Sauerstoffversorgung  $< 1$  mg  $kg^{-1}$  auf die Möglichkeit der Ausbildung anaerober Zonen in Gülle hin. Der Sauerstoff-Gehalt in den Rinderexkrementen RE-4 und RE-5 lag direkt nach der Ausscheidung  $> 0.1$  mg  $kg^{-1}$ . Erst nach einer Lagerung der Ex- kremente von 5 bzw. 7 Tagen lag der Sauerstoff-Gehalt mit Werten  $< 0.1$  mg  $kg^{-1}$  im anaeroben Bereich.

**Tab. 11: Veränderung der Zusammensetzung von Rindeexkrementen während der Konditionierungsphase**

Parameter	Rinderexkrement (RE-4)	Rinderexkrement (RE-5)
TS [%]	$13 \pm 1$	$12 \pm 0$
TOC [g $kg^{-1}$ ]	$51 \pm 3$	$40 \pm 3$
pH	$6.2 \pm 0.2$	$6.5 \pm 0.2$
Eh [mV]	$< 150$	$< 150$ (ab Tag 1)
$O_2$ [mg $kg^{-1}$ ]	Tag 0 bis 5: $\geq 0.1$ Tag 5 bis 20: $< 0.1$	Tag 0 bis 7: $\geq 0.1$ Tag 7 bis 21: $< 0.1$
$NH_4-N$ [g $kg^{-1}$ ]	Tag 0 bis 8: 1.0 bis 1.6 Tag 8 bis 20: $1.7 \pm 0.1$	Tag 0 bis 14: 0.8 bis 1.2 Tag 14 bis 21: $1.2 \pm 0.0$
$N_{total}$ [g $kg^{-1}$ ]	$3.6 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.2$
$NH_4-N / N_{total}$	0.3 bis 0.5	0.3 bis 0.4
$BSB_5$ [g $kg^{-1}$ ]	$23 \pm 4$	$8 \pm 2$
CSB [g $kg^{-1}$ ]	$83 \pm 8$	$62 \pm 8$
$BSB_5 / CSB$	0.3	0.1

Zu den nach der Ausscheidung schnell ablaufenden Abbauprozessen in Exkrementen zählt unter anderem die Umsetzung von Ammonium aus leicht verfügbaren Stickstoff-



verbindungen, wie z.B. Harnstoff (Hoffmann und Hege, 1991; Hütther, 1999; Möller et al., 2004). Die Ergebnisse zeigten, dass innerhalb der Lagerung von 8 bzw. 14 Tagen eine schnelle Zunahme des Ammonium-Stickstoff-Gehalts von 1.0 auf 1.6 g kg<sup>-1</sup> bzw. von 0.8 bis 1.2 g kg<sup>-1</sup> erfolgte. Danach konnte in beiden Exkrementen bis Tag 20 bzw. 21 nur noch eine geringe Ammonium-Stickstoff-Zunahme von 1.6 auf 1.8 g kg<sup>-1</sup> bzw. ein stabiler Wert von 1.2 g kg<sup>-1</sup> ermittelt werden.

Hahne (2002) schlägt für die Angabe des Alters einer Gülle einen Quotienten aus Ammonium-Stickstoff-Gehalt dividiert durch den Gesamt-Stickstoff-Gehalt ( $\text{NH}_4\text{-N}/\text{N}_{\text{total}}$ ) vor, da mit zunehmender Alterung der Ammonium-Stickstoff-Gehalt in der Matrix durch weiteren Abbau der enthaltenen Stickstoffverbindungen ansteigt. Damit wären anhand des Quotienten unterschiedlich alte Güllematrizes zu unterscheiden. Während der Konditionierung konnte eine Zunahme des Quotienten von 0.3 auf 0.5 bzw. 0.4 in den Rinderexkrementen RE-4 und RE-5 verzeichnet werden, womit nach der Definition von Hahne (2002) ein Hinweis auf die Alterung der Gülle gegeben wäre.

Ein weiterer Quotient kann aus dem Verhältnis zwischen biologischem und chemischem Sauerstoffbedarf ( $\text{BSB}_5/\text{CSB}$ ) gebildet werden. Dieser Quotient leitet sich aus der Abwasserbewertung ab (Hütter, 1994). Die Relation der beiden Werte liefert eine Aussage über die Abbaubarkeit der enthaltenen organischen Substanz in Abwasser: je größer der Quotient desto schneller sind die Bestandteile einer wässrigen Lösung abbaubar. Leichte Abbaubarkeit wird durch ein Verhältnis von 0.5 bis 1 gekennzeichnet, ein Verhältnis  $< 0.5$  zeigt eine geringe Abbaubarkeit an. Ab einem Verhältnis von  $< 0.1$  wird kein Abbau mehr angenommen. Hahne (2002) zieht diesen Quotienten für die Beurteilung der Abbaubarkeit in Schweinegülle heran. Demnach war die organische Substanz in den konditionierten Rinderexkrementen mit einem  $\text{BSB}_5/\text{CSB}$ -Verhältnis von 0.3 bzw. 0.1 in sehr geringem Maß biologisch abbaubar. Baaders et al. (1977) meinen jedoch, dass der biologische Sauerstoffbedarf in Exkrementen bzw. Gülle nicht die gleiche Aussagekraft hat wie in Abwasser, da hier spezifische Stoffe langsamer abgebaut werden. Danach könne der biologische Sauerstoffbedarf in 5 Tagen in Exkrementen und Gülle immer nur die untere Grenze der biologischen Abbaubarkeit anzeigen. Zudem unterliegt Gülle in der Regel anaeroben Milieubedingungen. Der anaerobe Abbau kann jedoch mittels des biologischen Sauerstoffbedarfs nicht erfasst werden. Der biologische Sauerstoffbedarf kann dennoch als Indikator für die mikrobiellen Abbauprozesse und damit indirekt für die Aktivität anaerober bzw. fakultativ anaerober Mikroorganismen in den Exkrementen und Gülle herangezogen werden und stellt einen ersten Schritt für die Beurteilung der mikrobiellen Aktivität in diesen Matrizes dar. Wie aus **Tab. 11** hervorgeht blieben, abgesehen vom Sauerstoff

und Ammonium-Stickstoff-Gehalt, die Parameter während der insgesamt 20 bzw. 21-tägigen Lagerung relativ konstant.

Für Schweinegülle erfolgte die Überprüfung der Konditionierungsphase anhand der Exkrement SE-4 und SE-5. Auch hier blieben die Parameter bis auf den Sauerstoff-Gehalt und den Ammonium-Stickstoff-Gehalt über die Dauer der Konditionierungsphase von 21 bzw. 28 Tagen relativ konstant (**Tab. 12**).

**Tab. 12: Veränderung der Zusammensetzung von Schweineexkrementen während der Konditionierungsphase**

Parameter	Schweineexkrement (SE-4)	Schweineexkrement (SE-5)
<b>TS</b> [%]	17 ± 1	16 ± 0
<b>TOC</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	64 ± 4	72 ± 9
<b>pH</b>	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2
<b>Eh</b> [mV]	< 150	< 150
<b>O<sub>2</sub></b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	Tag 0-6: ≥ 0.1 Tag 6-21: < 0.1	Tag 0-7: ≥ 0.1 Tag 7-28: < 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	Tag 0-13: 3.6 bis 5.6 Tag 13-21: 5.5 ± 0.1	Tag 0-22: 2.8 bis 5.8 Tag 22-28: 5.8 ± 0.0
<b>N<sub>total</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	9.0 ± 0.2	8.9 ± 0.4
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.4 bis 0.6	0.3 bis 0.6
<b>BSB<sub>5</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	24 ± 2	22 ± 1
<b>CSB</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	120 ± 8	147 ± 11
<b>BSB<sub>5</sub> / CSB</b>	0.2	0.2

Anaerobe Bedingungen nach der Definition eines Sauerstoff-Gehalts < 0.1 mg kg<sup>-1</sup> wurden in den Schweineexkrementen nach 6 bzw. 7 Tagen Lagerzeit erreicht. Das Redoxpotential variierte auch in den Schweineexkrementen in weiten Grenzen zwischen -190 mV und +40 mV, blieb jedoch auch hier immer < +150 mV, was ebenfalls auf anaerobe Milieubedingungen schließen ließ. Die schnell ablaufenden Umsetzungsprozesse der Stickstoffverbindungen zu Ammonium war im Exkrement SE-4 nach 13 Tagen mit einer Zunahme von 3.6 g kg<sup>-1</sup> auf 5.6 g kg<sup>-1</sup> abgeschlossen. Zwischen Tag 13 und Tag 21 konnte keine weitere Zunahme des Ammonium-Stickstoff-Gehalts gemessen werden. Im Exkrement SE-5 war die Phase der schnellen Ammoniumumsetzung mit einer Zunahme von 2.8 g kg<sup>-1</sup> auf 5.8 g kg<sup>-1</sup> erst nach 22 Tagen abgeschlossen. Zwischen Tag 21 und Tag 28 blieb der Wert konstant. Auch in den Schweineexkrementen war eine Zunahme des Quo-

tienten aus Ammonium-Stickstoff- zu Gesamt-Stickstoff-Gehalt ( $\text{NH}_4\text{-N}/\text{N}_{\text{total}}$ ) von 0.3 bzw. 0.4 auf 0.6 über die Konditionierungsphase als Indikator für das zunehmende Alter der Exkreme zu verzeichnen.

#### 4.1.2 Effekte der Exkrementlagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Nach der Konditionierung wurden die Exkreme direkt für die Herstellung der Referenzgülle verwendet oder für eine spätere Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Überprüfung in wie weit sich die Zusammensetzung der Exkreme während der Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ändert, wurde die Zusammensetzung jeweils eines Rinder- und Schweineexkremes in verschiedenen Abständen überprüft. Die nach der Konditionierungsphase bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Rinderexkreme (RE-1) wurden nach Lagerzeiten von 19, 184 und 378 Tagen aufgetaut und jeweils 3 Tage bei Raumtemperatur zur Reaktivierung der exkrementinhärenten Mikroorganismen adaptiert. Die anschließend gemessenen Parameter zeigen, dass sich die Exkreme während der Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht wesentlich veränderten (**Tab. 13**). Die Milieubedingungen lagen mit einem Redoxpotential von  $< +150\text{ mV}$  und einem Sauerstoff-Gehalt von  $< 0.1\text{ mg kg}^{-1}$  zu jeder Zeit im anaeroben Bereich.

**Tab. 13: Zusammensetzung eines konditionierten Rinderexkremes (RE-1) während der Langzeitlagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$**

Rinderexkrement (RE-1)	Lagerzeit			
Parameter	vor Lagerung	19 Tage	184 Tage	378 Tage
TS [%]	13	13	14	13
TOC [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	53	47	39	46
pH	6.8	6.5	6.5	7.4
Eh [mV]	60	100	130	-140
$\text{O}_2$ [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$
$\text{NH}_4\text{-N}$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	1.7	1.5	1.7	1.7
$\text{N}_{\text{total}}$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	4.3	4.0	4.0	4.0
$\text{NH}_4\text{-N}/\text{N}_{\text{total}}$	0.4	0.4	0.4	0.4
$\text{BSB}_5$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	7.6	7.6	11	9.1
CSB [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	80	73	88	63

Neben dem Ammonium-Stickstoff-Gehalt kann der organische Kohlenstoff als Indikator für die in Exkrement- und Gülleproben ablaufenden Umsetzungsprozesse herangezogen werden, wobei sich mit zunehmender Umsetzung der Anteil des organischen Kohlenstoffs verringert. Anhand des organischen Kohlenstoffs konnte mit 47, 39 und 46 g kg<sup>-1</sup> nach 19, 184 und 378 Tagen kein Abbau der organischen Substanz in den untersuchten Rinderexkrementen während der Lagerung bei -20 °C aufgezeigt werden. Der Ammonium-Stickstoff-Gehalt in den Exkrement-Proben wies mit 1.6 ± 0.1 g kg<sup>-1</sup> ebenfalls darauf hin, dass während der Lagerung bei -20 °C keine Umsetzungsprozesse in den Exkrementen stattfanden. Neben Hahne (2001) ziehen auch Bouwman und Reus (1994) und Moral et al. (2005) den chemischen Sauerstoffbedarf zur Beurteilung des in der Gülle enthaltenen Anteils an biologisch abbaubarer, organischer Substanz heran. Die Abnahme des chemischen Sauerstoffbedarfs könnte somit ebenfalls eine Information über Umsetzungsprozesse in Exkrementen geben. Allerdings wird mit dem chemischen Sauerstoffbedarf auch die oxidierbaren anorganischen Substanzen erfasst (Braun et al., 1999).

Der biologische Sauerstoffbedarf als Indikator für die mikrobiellen Abbauprozesse und damit indirekt für die Aktivität anaerober bzw. fakultativ anaerober Mikroorganismen in den Exkrementen ließ trotz der Variabilität der Werte von 9.2 ± 1.7 g kg<sup>-1</sup> darauf schließen, dass die Exkremente über die 378-tägige Lagerung bei -20 °C mikrobiell aktiv blieben.

**Tab. 14: Zusammensetzung eines konditionierten Schweineexkrement (SE-1) während der Langzeitlagerung bei -20 °C**

Schweineexkrement (SE-1)	Lagerzeit			
Parameter	vor Lagerung	7 Tage	110 Tage	322 Tage
TS [%]	22	23	21	22
TOC [g kg <sup>-1</sup> ]	70	60	73	96
pH	7.3	7.3	7.2	7.3
Eh [mV]	-140	-10	-270	-30
O <sub>2</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
NH <sub>4</sub> -N [g kg <sup>-1</sup> ]	8.3	9.0	9.3	9.0
N <sub>total</sub> [g kg <sup>-1</sup> ]	14.0	13.8	13.7	13.8
NH <sub>4</sub> -N/ N <sub>total</sub>	0.6	0.7	0.7	0.7
BSB <sub>5</sub> [g kg <sup>-1</sup> ]	29	28	26	23
CSB [g kg <sup>-1</sup> ]	182	135	169	179

Wie aus **Tab. 14** hervorgeht, veränderte sich die Zusammensetzung der Schweineexkremente während der Lagerung bei -20 °C in 322 Tagen ebenfalls nicht wesentlich. Auch hier lagen über die gesamte Lagerungszeit konstant anaerobe Bedingungen mit einem Redoxpotential von < +150 mV und einem Sauerstoff-Gehalt von < 0.1 mg kg<sup>-1</sup> vor. Weder der organische Kohlenstoff, noch der durchschnittliche Ammonium-Stickstoff-Gehalt von  $9.1 \pm 0.2$  g kg<sup>-1</sup> lieferten einen Hinweis auf während der Exkrementlagerung ablaufende Umsetzungsprozesse. Die Schweineexkremente blieben über die 322-tägige Lagerung bei -20 °C gemessen an einem biologischen Sauerstoffbedarf von  $26 \pm 3$  g kg<sup>-1</sup> mikrobiell aktiv.

#### **4.1.3 Vergleich der Exkrement- und Referenzgüllematrizes**

Die von verschiedenen Tieren bzw. Tiergruppen stammenden Rinder- und Schweineexkremente und die daraus hergestellten Referenzgüllematrizes wurden einer umfassenden Matrixcharakterisierung unterzogen, um die Schwankungsbreite der Zusammensetzung der Matrizes bestimmen zu können.

Durch den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgten innovativen Ansatz der Herstellung von Referenzgüllematrizes aus konditionierten Rinderexkrementen ließ sich die Variabilität der meisten Parameter durch die Einstellung auf einen einheitlichen Trockensubstanz-Gehalt von 10 % verringern (**Tab. 15**). Deutlich wird dies im Vergleich zu der Zusammensetzung von Rindergülle aus der landwirtschaftlichen Praxis (Tab. 2, Seite 6). So liegen die aus der Literatur bekannten Daten für den organischen Kohlenstoff-Gehalt in Rindergülle zwischen 10 und 75 g kg<sup>-1</sup> (Burton et al., 2003). Nach Herstellung der Referenzgülle variierte der organische Kohlenstoff-Gehalt lediglich zwischen 37 und 44 g kg<sup>-1</sup>. Ein weiteres Beispiel für die Einschränkung der Variabilität ist der Ammonium-Stickstoff-Gehalt, welcher in Literaturangaben zwischen 0.01 und 4.9 g kg<sup>-1</sup> (Burton et al., 2003; Merkel, 2005) und in der Referenzgülle zwischen 0.9 und 4.0 g kg<sup>-1</sup> lag.

Tab. 15: Zusammensetzung der Rinderexkremente (RE) und der daraus hergestellten Referenzgüllematrizes

	Rinderexkremente						Referenzgülle					
Parameter	RE-1	RE-2	RE-3	RE-4	RE-5	RE-6	RG-1	RG-2	RG-3	RG-4	RG-5	RG-6
<b>TS</b> [%]	13	13	10	13	12	13	auf 10 % eingestellt					
<b>R<sub>min</sub></b> [% TS]	19	15	24	15	12	13	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	13
<b>Cu</b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	13	7	6	12	6	7	10*	5*	6*	9*	5*	5*
<b>P</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	0.9	0.7	1.1	1.0	0.7	0.9	0.7*	0.6*	1.1*	0.8*	0.6*	0.8*
<b>TOC</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	47	54	40	50	42	57	39	42	39	39	37	44
<b>pH</b>	6.9	8.4	8.0	6.2	6.5	6.3	7.0	8.1	8.0	6.6	6.6	6.7
<b>Eh</b> [mV]	40	10	-20	-40	-40	-100	-40	-80	-20	10	-100	-160
<b>O<sub>2</sub></b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
<b>NH<sub>4</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	1.6	4.5	4.0	1.6	1.2	2.3	1.3	3.2	4.0	1.3	0.9	1.6
<b>N<sub>total</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	4.1	6.4	6.5	3.5	3.1	4.4	3.2	5.0	6.5	2.6	2.5	3.8
<b>NH<sub>4</sub> / N<sub>total</sub></b>	0.4	0.7	0.6	0.5	0.4	0.5	0.4	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4
<b>BSB<sub>5</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	9.4	11	6.0	23	8.5	18	8.3	7.3	6.0	14	9.3	9.9
<b>CSB</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	76	70	65	83	62	120	71	60	65	50	59	112

\* Werte aus den Ergebnissen der Exkremente errechnet; n.u.: nicht untersucht; RG: Rindergülle

Auch der biologische Sauerstoffbedarf in 5 Tagen, der nach Schuchardt und Hahne (1996) je nach Trockensubstanzgehalt zwischen 12 und 34 g kg<sup>-1</sup> liegt, ließ sich durch die Einstellung der Referenzgülle auf einen Trockensubstanzgehalt von 10 % auf 6.0 bis 14 g kg<sup>-1</sup> einschränken. Für den Kupfer-, Phosphor- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt konnte ebenfalls eine Verringerung der Variabilität durch Einstellung auf einen definierten Trockensubstanzgehalt nachgewiesen werden. Sowohl in den Exkrementen als auch der Gülle herrschten mit einem Redoxpotential von < +150 mV und einem Sauerstoff-Gehalt von < 0.1 mg kg<sup>-1</sup> anaerobe Bedingungen vor.

Eine weitere Einschränkung der Variabilität ließ sich dadurch erreichen, dass für die Herstellung der Referenzgülle Rinderexkreme von Tieren des gleichen Bestandes unter ähnlichen Fütterungsbedingungen verwendet wurden. So ließ sich in den 4 Güllematrizes (RG-1, RG-4, RG-5 und RG-6), welche aus Exkrementen von Milchkühen aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung hergestellt wurden, ein durchschnittlicher pH-Wert von  $6.7 \pm 0.2$ , ein Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt von  $1.3 \pm 0.3$  g kg<sup>-1</sup> bzw.  $3.0 \pm 0.6$  g kg<sup>-1</sup> und ein biologischer Sauerstoffbedarf von  $10 \pm 3$  g kg<sup>-1</sup> ermitteln. Im Vergleich hierzu wies die aus den Exkrementen eines 8 Monate alten Jungrinds hergestellte Referenzgülle RG-2 mit 8.1 einen etwas höheren pH-Wert auf. Der Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt lag mit 3.2 bzw. 5.0 g kg<sup>-1</sup> ebenfalls etwas höher als in der Referenzgülle aus Milchviehexkrementen. Auch die aus Exkrementen einer Milchkuh aus einem Milchviehbetrieb hergestellte Referenzgülle RG-3 wies im Vergleich einen etwas höheren Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt mit 4.0 bzw. 6.5 g kg<sup>-1</sup> sowie einen höheren pH-Wert von 8.0 auf.

Die Herstellung von Referenzgüllematrizes aus konditionierten Schweineexkrementen verringerte die Schwankungsbreite der meisten Parameter durch die Einstellung auf einen einheitlichen Trockensubstanzgehalt von 5 % ebenfalls deutlich (**Tab. 16**). So finden sich in der Literatur (Tab. 3, Seite 7) Werte für den organischen Kohlenstoff-Gehalt in Schweinegülle von 5 bis 77.3 g kg<sup>-1</sup> (Burton et al., 2003; Hahne, 2001). In der Referenzgülle lag der organische Kohlenstoff-Gehalt zwischen 18 bis 22 g kg<sup>-1</sup>. Der Ammonium-Stickstoff-Gehalt von Schweinegülle variiert in den Literaturangaben zwischen 0.3 und 7.7 g kg<sup>-1</sup> (Hahne, 2001; Merkel, 2005). In der hergestellten Referenzgülle finden sich dagegen Ammonium-Stickstoff-Gehalte von 0.9 bis 2.0 g kg<sup>-1</sup>. Ein weiteres Beispiel für die eingeschränkte Variabilität bietet der biologische Sauerstoffbedarf. Hier liegt die Schwankungsbreite der Werte in den Referenzgüllematrizes mit 9.1 bis 12 g kg<sup>-1</sup> deutlich unter den Literaturwerten mit 7.9 bis 69 g kg<sup>-1</sup> (Hahne, 2001; Ndegwa et al., 2003).

Tab. 16: Zusammensetzung der Schweineexkreme (SE) und der daraus hergestellten Referenzgüllematrizes

	Schweineexkreme						Referenzgülle					
Parameter	SE-1	SE-2	SE-3	SE-4	SE-5	SE-6	SG-1	SG-2	SG-3	SG-4	SG-5	SG-6
<b>TS</b> [%]	23	18	21	17	16	13	auf 5 % eingestellt					
<b>R<sub>min</sub></b> [% TS]	22	19	15	21	17	16	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	16
<b>Cu</b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	25	29	29	16	16	8	6*	8*	7*	5*	5*	3*
<b>P</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	4.4	3.8	2.2	2.3	3.0	2.4	1.0*	1.1*	0.5*	0.7*	0.9*	1.0*
<b>TOC</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	74	93	103	66	70	56	19	20	21	22	20	18
<b>pH</b>	7.4	7.3	5.7	6.3	6.1	6.8	7.7	7.0	5.8	7.5	6.7	7.3
<b>Eh</b> [mV]	-130	-90	40	-50	-100	-180	-180	-90	60	-170	-110	-180
<b>O<sub>2</sub></b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
<b>NH<sub>4</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	9.2	6.2	3.4	5.8	5.7	4.5	1.9	2.0	0.9	2.0	1.7	1.8
<b>N<sub>total</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	13.8	9.9	9.4	9.0	8.9	6.8	3.0	3.0	2.3	2.6	2.7	2.8
<b>NH<sub>4</sub> / N<sub>total</sub></b>	0.7	0.6	0.4	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.4	0.8	0.6	0.6
<b>BSB<sub>5</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	27	23	28	25	21	21	10	10	10	12	9.5	9.1
<b>CSB</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	173	98	153	124	147	103	40	41	41	32	49	48

\* Werte aus den Ergebnissen der Exkreme errechnet; n.u.: nicht untersucht; SG = Schweinegülle



Sowohl in den konditionierten Schweineexkrementen als auch in der daraus hergestellten Referenzgülle lagen anaerobe Bedingungen mit einem Redoxpotential  $< +150$  mV und einem Sauerstoff-Gehalt  $< 0.1$  mg kg<sup>-1</sup> vor.

Aufgrund des omnivoren Ernährungstyps von Schweinen können die Fütterungsbedingungen der einzelnen Tierbestände stark variieren. Durch die Herstellung der Referenzgülle aus Schweineexkrementen von Tieren des selben Betriebes mit ähnlichen Fütterungsbedingungen ließ sich eine weitere Einschränkung der Variabilität erreichen. So wiesen die 4 Güllematrizes (SG-1, SG-4, SG-5 und SG-6) aus Exkrementen von konventionell gefütterten Mastschweinen aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung einen durchschnittlichen pH-Wert von  $7.3 \pm 0.4$ , einen Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt von  $1.9 \pm 0.1$  g kg<sup>-1</sup> bzw.  $2.8 \pm 0.2$  g kg<sup>-1</sup> und einen biologischen Sauerstoffbedarf von  $10 \pm 1$  g kg<sup>-1</sup> auf. Auch in der Gülle SG-2, welche ebenfalls aus Exkrementen von Mastschweinen aus dem Institut für Tierernährung stammen, ließ sich eine ganz ähnliche Zusammensetzung nachweisen, wobei die Tiere mit einem höheren Weizenanteil gefütterten wurden. Die Gülle SG-3 aus Exkrementen von Tieren des Mastschweinbetriebes Hof Beyer wies mit pH 5.8 und einem Ammonium-Stickstoff- bzw. Gesamt-Stickstoff-Gehalt von  $0.9$  g kg<sup>-1</sup> und  $2.3$  g kg<sup>-1</sup> geringere Werte auf.

## 4.2 Qualitätssicherung zur Matrixcharakterisierung

Als Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Matrixcharakterisierung wurden für die Parameter organischer Gesamt-Kohlenstoff (TOC), Ammonium-Stickstoff (NH<sub>4</sub>-N), Gesamt-Stickstoff (N<sub>total</sub>) und chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) zusätzlich zu den Proben regelmäßig entsprechende Standards untersucht. Für die Parameter Trockensubstanz (TS), mineralischer Gehalt (R<sub>min</sub>) und chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) wurden darüber hinaus Vergleichsmessungen durchgeführt. Nach Beendigung der Methodenentwicklung schloss sich ein laborinterner Ringtest an.

### Trockensubstanz-Bestimmung (TS)

Der Vergleich der Ergebnisse der Trockensubstanz-Bestimmung mittels Infrarot-Strahler und Trocknung der Probe bei 105 °C nach DIN ISO 11465 (1996) zeigte mit einer Abweichung von  $\pm 1$  % in allen untersuchten Matrizes eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden (**Tab. 17**). Durch die Verwendung des Infrarot-Strahlers war eine zeitnahe Bestimmung der Trockensubstanz der Exkremente als Vorbereitung auf die Herstellung der jeweiligen Referenzgülle möglich.

Der Methodenvergleich beweist, dass die zeitsparende Bestimmung der Trockensubstanz mittels Infrarot-Strahler in Exkrement- und Gülle-Proben alternativ anwendbar ist und im Rahmen des „Gülle-Projektes“ ohne Qualitätsverlust eingesetzt werden konnte.

**Tab. 17: Methodenvergleich der Trockensubstanz-Bestimmung (TS) ( $n \geq 4$ )**

Probe	DIN ISO 11465 TS [%]	IR-Strahler TS [%]	Ø TS [%]	VC <sub>V</sub> [%]
Rinderexkrement	11 ± 1	12 ± 1	<b>12 ± 1</b>	6.1
Rindergülle	9 ± 1	9 ± 1	<b>9 ± 0</b>	0.0
Schweineexkrement	21 ± 0	23 ± 1	<b>22 ± 1</b>	6.4
Schweinegülle	4 ± 1	5 ± 1	<b>5 ± 1</b>	15.7

VC<sub>V</sub>: Variationskoeffizient der Vergleichsmessung, IR: Infrarot

#### Mineralischer Gehalt ( $R_{\min}$ )

Zur Überprüfung der Bestimmung des mineralischen Gehalts wurde dieser in drei Rinderexkrement-Proben im zeitlichen Abstand ein zweites Mal bestimmt. Die in **Tab. 18** dargestellten Ergebnisse zeigen mit  $19 \pm 2$  %,  $24 \pm 0$  % und  $15 \pm 1$  % eine hohe Übereinstimmung der Messergebnisse. Damit ist davon auszugehen, dass die Bestimmung des mineralischen Gehalts von Exkrementen anhand der beschriebenen Methode reproduzierbar anzuwenden ist.

**Tab. 18: Messung des mineralischen Gehalts ( $R_{\min}$ ) im zeitlichen Abstand**

Probe	$R_{\min}$ [% TS] 1. Messung	$R_{\min}$ [% TS] 2. Messung	Ø $R_{\min}$ [% TS]	VC <sub>V</sub> [%]
RE-1	20 ± 2	19 ± 3	<b>19 ± 2</b>	3.6
RE-3	24 ± 0	24 ± 0	<b>24 ± 0</b>	0.0
RE-4	16 ± 1	15 ± 0	<b>15 ± 1</b>	4.6

VC<sub>V</sub>: Variationskoeffizient der Vergleichsmessung; TS: Trockensubstanz; RE: Rinderexkrement

#### Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Die Überprüfung der Methode zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) mittels Küvettentest in Anlehnung an DIN ISO 15705 (2003), erfolgte durch eine Vergleichsmessung mittels konventionellem Aufschlussverfahren nach DIN 38409-41 (1980).

Aus den in **Tab. 19** dargestellten Daten wird ersichtlich, dass beide Methoden für die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs in Gülle zu ähnlichen Ergebnissen mit einem Variationskoeffizienten von 2 bis 8 % führten. Damit wäre der handelsübliche Küvettentest aufgrund der schnellen Durchführbarkeit sowie der möglichen Bearbeitung einer deutlich größeren Probenzahl und nicht zuletzt aufgrund der geringeren Umweltschädlichkeit für die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs in Gülle zu bevorzugen.

**Tab. 19: Methodenvergleich zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB)**

<b>Probe</b>	<b>CSB Küvettentest [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>CSB DIN 38409-41 [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>Ø CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>VC<sub>v</sub> [%]</b>
<b>Standard</b>	101	96	<b>99 ± 4</b>	3.6
<b>Rinderexkrement</b>	56	42	<b>49 ± 10</b>	20.2
<b>Rindergülle</b>	37	38	<b>38 ± 1</b>	1.9
<b>Schweineexkrement</b>	111	82	<b>97 ± 21</b>	21.2
<b>Schweinegülle (SG-1)</b>	29	26	<b>28 ± 2</b>	7.7
<b>Schweinegülle (SG-2)</b>	37	35	<b>36 ± 1</b>	3.9

VC<sub>v</sub>: Variationskoeffizient der Vergleichsmessung

Die Messergebnisse der Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs in den Exkrement-Proben wiesen hingegen eine prozentuale Abweichung von 20 bzw. 21 % auf. Die Ursache hierfür könnte zum einen darin begründet sein, dass sich die Exkremente aufgrund des höheren Trockensubstanzgehaltes nicht vollständig homogenisieren ließen. Zum anderen erfolgt die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs im Küvettentest über die Extinktionsmessung. Messfehler, welche durch die gefärbten Probenmatrizes und einer daraus resultierenden Beeinträchtigung der photometrischen Messung hervorgerufen werden könnten, sind hier nicht auszuschließen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs keine gesicherte Aussage über den in Exkrementen enthaltenen Anteil abbaubarer, organischer Substanz getroffen werden. Damit ist der Nutzen des chemischen Sauerstoffbedarfs zur Charakterisierung von Exkrementen und Gülle fraglich. Auch ist die Aussagekraft des chemischen Sauerstoffbedarfs im Bezug auf Tierarzneimittel gering, da keine Kenntnisse über einen Einfluss vorliegen. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde der chemischen Sauerstoffbedarf im Folgenden dennoch erfasst, jedoch nicht in die Beurteilung der Matrizes einbezogen.

### Messung von Standards

Im Rahmen der Qualitätssicherung wurden für die Bestimmung des organischen Kohlenstoffs, des Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalts sowie des chemischen Sauerstoffbedarfs zusätzlich Standardmessungen bzw. Standardmessungen nach Probenaufstockung gemäß den in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Methoden durchgeführt.

Die Standardmessungen des organischen Gesamt-Kohlenstoffs zeigte mit 99 % eine hohe Qualität der durchgeführten Messmethode sowie der Gerätefunktion (**Tab. 20**). Auch für den Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt konnten sowohl für die Standards als auch für die Standards nach Probenaufstockung Wiederfindungsraten um 100 % erreicht werden. Für den chemischen Sauerstoffbedarf konnte mit 105 % ebenfalls eine hohe Qualität für den eingesetzten Küvettentest bzw. die Gerätefunktion bestätigt werden. Die Standardmessung nach Probenaufstockung führte lediglich zu einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 77 %.

**Tab. 20: Wiederfindungsraten (WFR) verschiedener Standards**

Methode	TOC		NH <sub>4</sub> -N		N <sub>total</sub>		CSB	
	n	WFR [%]	n	WFR [%]	n	WFR [%]	n	WFR [%]
<b>Standard</b>	30	99 ± 6	8	99 ± 1	5	97 ± 8	20	105 ± 10
<b>Proben-aufstockung</b>	n.u.	n.u.	52	100 ± 12	48	101 ± 6	6	77 ± 9

n: Anzahl der Messungen; n.u.: nicht untersucht; TOC: organischer Gesamt-Kohlenstoff; NH<sub>4</sub>-N: Ammonium-Stickstoff; N<sub>total</sub>: Gesamt-Stickstoff; CSB: chemischer Sauerstoffbedarf

### Validierung der Charakterisierungsmethoden im internen Ringversuch

Ein laborinterner Ringtest mit 4 Teilnehmern zeigte, dass der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methodenkatalog zur Charakterisierung von Exkrementen Referenzgülematrizes, unabhängig von den Vorkenntnissen der Anwender, zu weitgehend reproduzierbaren Ergebnissen führt (**Tab. 21**). Auch hier konnte, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, eine hohe Übereinstimmung der Bestimmung des Trockensubstanzgehalts mittels Infrarot-Strahler und der nach DIN ISO 11465 durchgeführten Trocknung der Proben bei 105 °C mit maximalen Abweichungen von 1 % ermittelt werden. Sowohl der Ammonium-Stickstoff als auch der Gesamt-Stickstoff zeigten mit einer maximalen Abweichungen von 0.1 g kg<sup>-1</sup> ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der von den verschiedenen Teilnehmer ermittelten Messergebnisse. Die Abweichung des Gesamt-Kohlenstoffs in den Schweinexkrementen (SE-1) mit 17 g kg<sup>-1</sup> ist darauf zurückzuführen, dass einige der

Teilnehmer diese Methode vor der Durchführung des Ringtests noch nie angewendet haben, wobei sich über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte, dass sich die Fehlerträchtigkeit dieser Methode durch den routinemäßigen Gebrauch verringern ließ. In allen untersuchten Matrices lagen, gemessen an einem Redoxpotential  $< +150$  mV und einem Sauerstoff-Gehalt  $< 0.1$  mg kg<sup>-1</sup>, anaerobe Milieubedingungen vor.

**Tab. 21: Ergebnisse des institutsinternen Ringtests**

Parameter	RE-5	RG-5	SE-1	SG-1
<b>TS<sub>ofen</sub> [%]</b>	10 ± 0	9 ± 0	21 ± 0	5 ± 1
<b>TS<sub>IR</sub> [%]</b>	12 ± 1	10 ± 1	23 ± 1	6 ± 1
<b>R<sub>min</sub> [% TS]</b>	13 ± 1	n.u.	22 ± 2	n.u.
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	40 ± 4	37 ± 3	80 ± 17	19 ± 4
<b>pH</b>	6.4 ± 0.1	6.5 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.7 ± 0.2
<b>Eh [mV]</b>	- 80 ± 50	- 100 ± 30	- 190 ± 70	- 220 ± 30
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.1	9.3 ± 0.2	2.0 ± 0.1
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	2.9 ± 0.0	2.5 ± 0.1	13.7 ± 0.1	3.0 ± 0.0
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	12 ± 2.0	12*	20 ± 3.5	12*
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	61 ± 5	59 ± 6	179 ± 10	41 ± 3

n.u.: nicht untersucht; RE: Rinderexkrement; RG: Rindergülle; SE: Schweineexkrement; SG: Schweinegülle; \* n=1

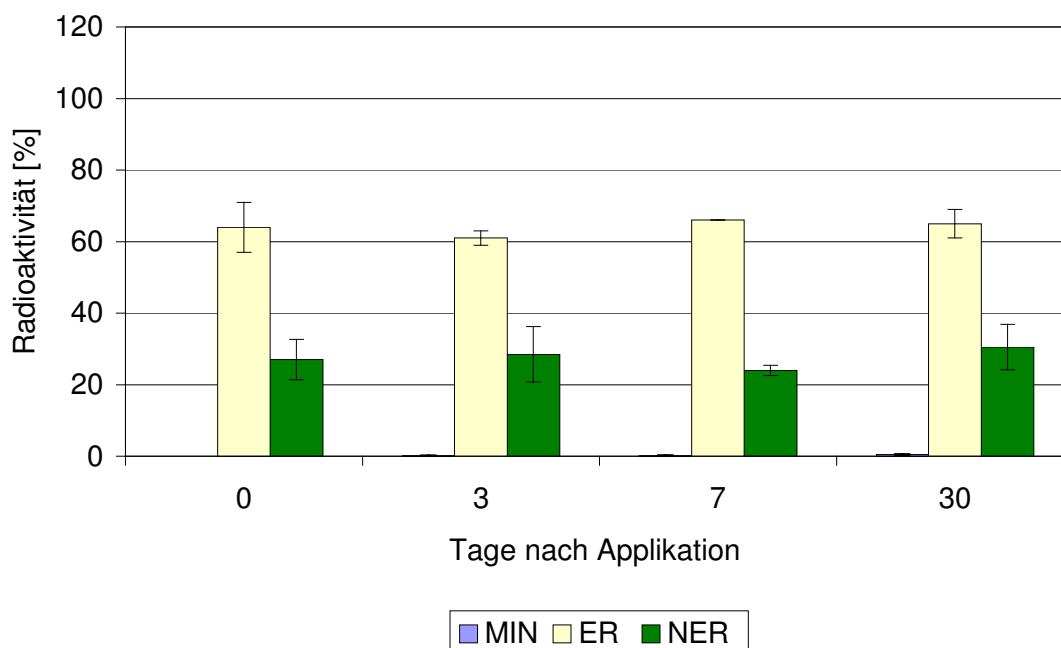
### 4.3 Voruntersuchungen für die Stabilitätstests

Um zu untersuchen, ob die Testsubstanzen in Gülle unter anaeroben Bedingungen <sup>14</sup>C-Kohlendioxid freisetzen, wurde ein Kurzzeittest mit <sup>14</sup>C-Ibuprofen durchgeführt, welches in Abbautests in Boden und Klärschlamm eine schnelle Mineralisation aufwies (Kreuzig et al., 2005). Zur Extraktion von <sup>14</sup>C-Sulfonamiden aus Rinder- und Schweinegülle wurden neben Ethylacetat weitere Extraktionsmittel für Gülle in undotierten Proben getestet und die Extraktionseffizienz von Ethylacetat für <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in beiden Matrices überprüft. In weiteren Vorversuchen wurde die Stabilität von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol sowie <sup>14</sup>C-Sulfadiazin in Rinder- und Schweinegülle in der Batch-Apparatur und der Durchfluss-Apparatur verglichen.

#### 4.3.1 Bestimmung von $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid

Im Kurzzeittest über 30 Tage wurde die Mineralisation des Analgetikums  $^{14}\text{C}$ -Ibuprofen in Schweinegülle anhand der in den internen  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxidfalle absorbierten Radioaktivität bestimmt, wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Bei dieser Substanz handelt es sich um das in der Humanmedizin eingesetzte Strukturanalogon von Ketoprofen.

Aus Abbautests von Ibuprofen in Klärschlamm ist eine relevante Mineralisationsrate von 15 % in 28 Tagen bekannt (Kreuzig et al., 2005; Kullmer, 2005). Zudem konnte in diesen Untersuchungen eine Abnahme der extrahierbaren Rückstände (ER) verbunden mit einer Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände (NER) von 6 auf 39 % in 28 Tagen aufgezeigt werden. Unter anaeroben Milieubedingungen in Schweinegülle konnte nach 30 Tagen eine maximale Mineralisationsrate von 0.4 % detektiert werden (**Abb. 7**). Der Anteil der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückstände blieb über die gesamte Inkubationsdauer annähernd konstant. Damit scheinen dynamische Abbauprozesse in Gülle im Vergleich zum Klärschlamm zugunsten der höheren Stabilität von Ibuprofen unterdrückt zu werden. Dennoch kann aufgrund der Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass radioaktiv markierte Testsubstanzen in Gülle unter Anwendung der beschriebenen Methode  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid freisetzen können.



**Abb. 7:** Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Ibuprofen in Schweinegülle (SG-1)

#### 4.3.2 Eignung verschiedener Extraktionsmittel für Gülleproben

In Vorversuchen ohne den Zusatz eines Radiotracers wurden neben Ethylacetat, dessen Eignung als Extraktionsmittel für Stabilitätstests in Gülle unter Anwendung verschiedener Methoden bekannt ist (Berger et al., 1986; Haller et al., 2002; Hamscher et al., 2005; Höltge, 2005; Kreuzig und Höltge, 2005; Kreuzig et al., 2007), Methanol, Methanol/Ethylacetat (1:1), Methanol/Cyclohexan (1:1), Aceton und Acetonitril auf ihre Eignung als Extraktionsmittel für Gülle in Bezug auf das Probenhandling getestet. Hierbei zeigten sich wie in **Tab. 22** beschrieben neben Ethylacetat auch Aceton und Acetonitril als prinzipiell geeignet.

**Tab. 22: Eignung verschiedener Extraktionsmittel für Gülle**

Extraktionsmittel	Rindergülle 10 % TS	Schweinegülle 5 % TS
<b>Ethylacetat</b>	Lösungsmittelüberstand Filtration möglich Aufkonzentrierung bis 5 mL möglich Extrakt nach Mikrofiltration frei von Schwebstoffen	Lösungsmittelüberstand Filtration möglich Aufkonzentrierung bis 2 mL möglich Extrakt frei von Schwebstoffen
<b>Methanol</b>	kein Lösungsmittelüberstand Trennung durch Filtration nur schwer möglich	kein Lösungsmittelüberstand Trennung durch Filtration nur schwer möglich
<b>Methanol/Ethylacetat (1:1)</b>	kein Lösungsmittelüberstand Trennung durch Filtration nur schwer möglich	n.u.
<b>Methanol/Cyclohexan (1:1)</b>	kein Lösungsmittelüberstand Trennung durch Filtration nur schwer möglich	n.u.
<b>Aceton</b>	Lösungsmittelüberstand Filtration möglich Aufkonzentrierung bis maximal ca. 60 mL möglich viele Schwebstoffe enthalten	Lösungsmittelüberstand Filtration möglich Aufkonzentrierung bis maximal ca. 60 mL möglich viele Schwebstoffe enthalten
<b>Acetonitril</b>	Lösungsmittelüberstand Filtration möglich Aufkonzentrierung bis maximal ca. 60 mL möglich viele Schwebstoffe enthalten	Lösungsmittelüberstand Filtration möglich Aufkonzentrierung bis maximal ca. 60 mL möglich viele Schwebstoffe enthalten

n.u.: nicht untersucht; TS: Trockensubstanz

Methanol und methanolhaltige Gemische ließen sich aufgrund der vollständigen Vermischung von Gülle und Lösungsmittel nur unter hohem materiellen und zeitlichen Aufwand filtrieren und wurden daher als Extraktionsmittel für Gülle im Rahmen der vorliegenden Arbeit als eher ungeeignet angesehen. Aceton und Acetonitril waren aufgrund der Handhabbarkeit der Filtration als Extraktionsmittel für Gülle prinzipiell geeignet. Allerdings war bei beiden Lösungsmitteln die Möglichkeit der weiteren Verwendung der Extrakte, z.B. für ein Metaboliten-Screening eingeschränkt, da ein Aufkonzentrieren der Extrakte, aufgrund des hohen Wassergehalts, nicht ohne weiteres möglich war. Für die Durchführung von Abbaustudien bzw. die Identifizierung von Metaboliten, bestünde hier die Möglichkeit der Probenaufreinigung und Substanzanreicherung der Sulfonamide aus dem wässrigen Eluat mittels Festphasenextraktion (Höltge, 2005; Pfeifer et al., 2002). Da die Aufklärung von Metabolismwegen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war und aufgrund des hohen Probenaufkommens wurde eine weitere Probenaufreinigung nicht in Betracht gezogen. Ein weiterer Vorteil von Ethylacetat als Extraktionsmittel war das vollständige, schnelle Absetzen von Schwebstoffen aus der Lösungsmittel/Gülle-Suspension, welches eine deutlich schnellere Aliquoteentnahme ermöglichte.

Somit wurde Ethylacetat aufgrund der Handhabbarkeit und der im Vorfeld der Untersuchungen bekannten Erkenntnisse als Extraktionsmittel für die Sulfonamide aus Gülle gewählt. Für die 3 Sulfonamide  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol,  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol sowie  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin konnte eine Extraktionseffizienz von 88 bis 102 % für Ethylacetat und 35 bis 73 % für Methanol in Rindergülle ermittelt werden (Höltge, 2005; Kreuzig und Höltge, 2005). Die Überprüfung der Extraktionseffizienz von Ethylacetat für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol aus Rinder- und Schweinegülle im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab ein ähnliches Ergebnis mit einer Extraktionseffizienz von  $94 \pm 2 \%$  aus Rindergülle und  $97 \pm 3 \%$  aus Schweinegülle (**Tab. 23**). Aufgrund der von Höltge (2005) im Stabilitätstest verwendeten Güllemenge von 50 g wurden zum Vergleich 50 g Gülle mit der entsprechenden Menge  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol dotiert und direkt nach der Applikation extrahiert. Hier konnte eine Extraktionseffizienz von  $103 \pm 7 \%$  aus Rindergülle und  $102 \pm 8 \%$  aus Schweinegülle erreicht werden.

**Tab. 23: Extraktionseffizienz von Ethylacetat für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol**

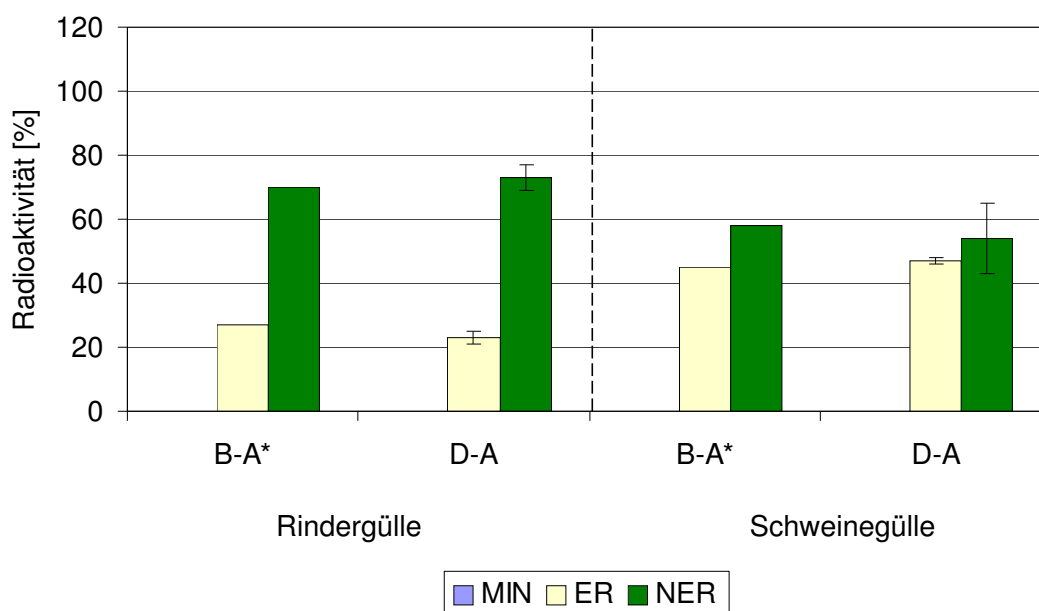
Güllemenge	Rindergülle		Schweinegülle	
	I	II	I	II
100 g	95	92	95	99
50 g	98	108	96	107

eingesetzt:  $560 \mu\text{g}$  Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle



### 4.3.3 Vergleich von Batch-Apparatur und Durchfluss-Apparatur

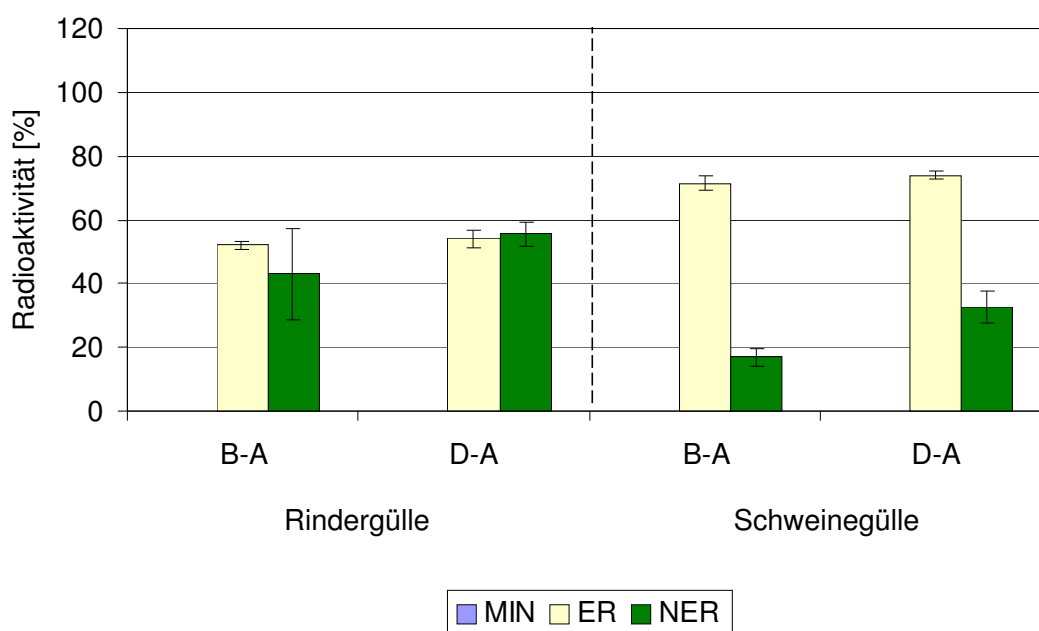
Die Bilanzierung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol anhand der Mineralisation, der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückstände wies, wie in **Abb. 8** dargestellt, nach 7-tägiger Inkubation in der Batch- und der Durchfluss-Apparatur kaum Unterschiede auf. So ließen sich aus Rindergülle nach Inkubation in der Batch-Apparatur 27 % der applizierten Ausgangsaktivität extrahieren. Nach Inkubation in der Durchfluss-Apparatur waren 23 % extrahierbar. Das in den Extrakten durchgeführte Metaboliten-Screening zeigte, dass in allen Extrakten die gesamte Aktivität auf nicht identifizierte Metaboliten entfiel. Auch die Rückstandssituation in der Schweinegülle wies mit 45 und 47 % extrahierbaren Rückständen und 58 bzw. 54 % nicht-extrahierbaren Rückständen in den Batch- bzw. Durchfluss-Apparaturen keinen wesentlichen Unterschied auf. In beiden Apparaturen konnten in Übereinstimmung der OECD-Richtlinie 307 (OECD, 2002), welche für den Test von radioaktiv markierten Chemikalien im Böden eine Wiederfindungsrate von 90-110 % fordert, Wiederfindungsraten von  $97 \pm 1$  % bzw.  $102 \pm 1$  % bestimmte werden. Anhand des durchgeführten Metaboliten-Screenings konnten noch 11 % bzw. 14 % in den Extrakten der applizierten Ausgangsaktivität als unverändertes Sulfamethoxazol identifiziert werden (siehe Anhang, **Tab.A3**). In beiden Systemen konnte keine relevante Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0.1 % nachgewiesen werden.



\*= Einfachbestimmung

**Abb. 8:** Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rinder- und Schweinegülle nach 7-tägiger Inkubation in der Batch-Apparatur (B-A) und der Durchfluss-Apparatur (D-A)

Ein weiterer Vergleich des Rückstandsverhaltens von Sulfonamiden in der Batch-Apparatur und der Durchfluss-Apparatur wurde mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin ebenfalls sowohl in Rinder- als auch in Schweinegülle durchgeführt. Auch hier war eine ähnliche Rückstandssituation der Substanz in der Batch- und der Durchfluss-Apparatur erkennbar (**Abb. 9**). Aus der Rindergülle ließen sich  $52 \pm 1$  % der applizierten Ausgangsaktivität nach Inkubation in der Batch-Apparatur extrahieren, nach Inkubation in der Durchfluss-Apparatur waren  $54 \pm 3$  % extrahierbar, wobei jeweils  $37 \pm 1$  bzw.  $34 \pm 1$  % der applizierten Ausgangsaktivität auf Sulfadiazin entfielen (siehe Anhang, **Tab.A5**). Im Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle zeigte sich mit einem Anteil von  $72 \pm 2$  % bzw.  $74 \pm 1$  % extrahierbaren Rückständen ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse nach Inkubation in der Batch- bzw. Durchfluss-Apparatur. Hier entfielen nach 7-tägiger Inkubation  $64 \pm 3$  bzw.  $70 \pm 1$  % auf die unveränderte Ausgangssubstanz. Während des Abbautests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin konnte weder in Rinder- noch in Schweinegülle eine relevante Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze bzw. weitere volatile Verbindungen nachgewiesen werden.



**Abb. 9:** Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rinder- und Schweinegülle nach 7-tägiger Inkubation in der Batch-Apparatur (B-A) und der Durchfluss-Apparatur (D-A)

#### 4.4 Stabilität von Sulfamethoxazol in Gülle

Das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rinder- und Schweinegülle wurde im Stabilitätstest über 177 Tage untersucht. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden beide Tests im Abstand von etwa einem Jahr wiederholt. Parallel zu den Stabilitätstests wurden Matrixcharakterisierungstests untersucht. Zusätzlich zu den Langzeit-Stabilitätstests wurden Kurzzeittests über 30 Tage durchgeführt, um den Einfluss der Inkubationstemperatur und des Trockensubstanzgehalts der Gülle auf das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol aufzuzeigen. In einem weiteren Kurzzeittest wurde der Einfluss verschiedener Rinder- und Schweinegüllematrizes untersucht.

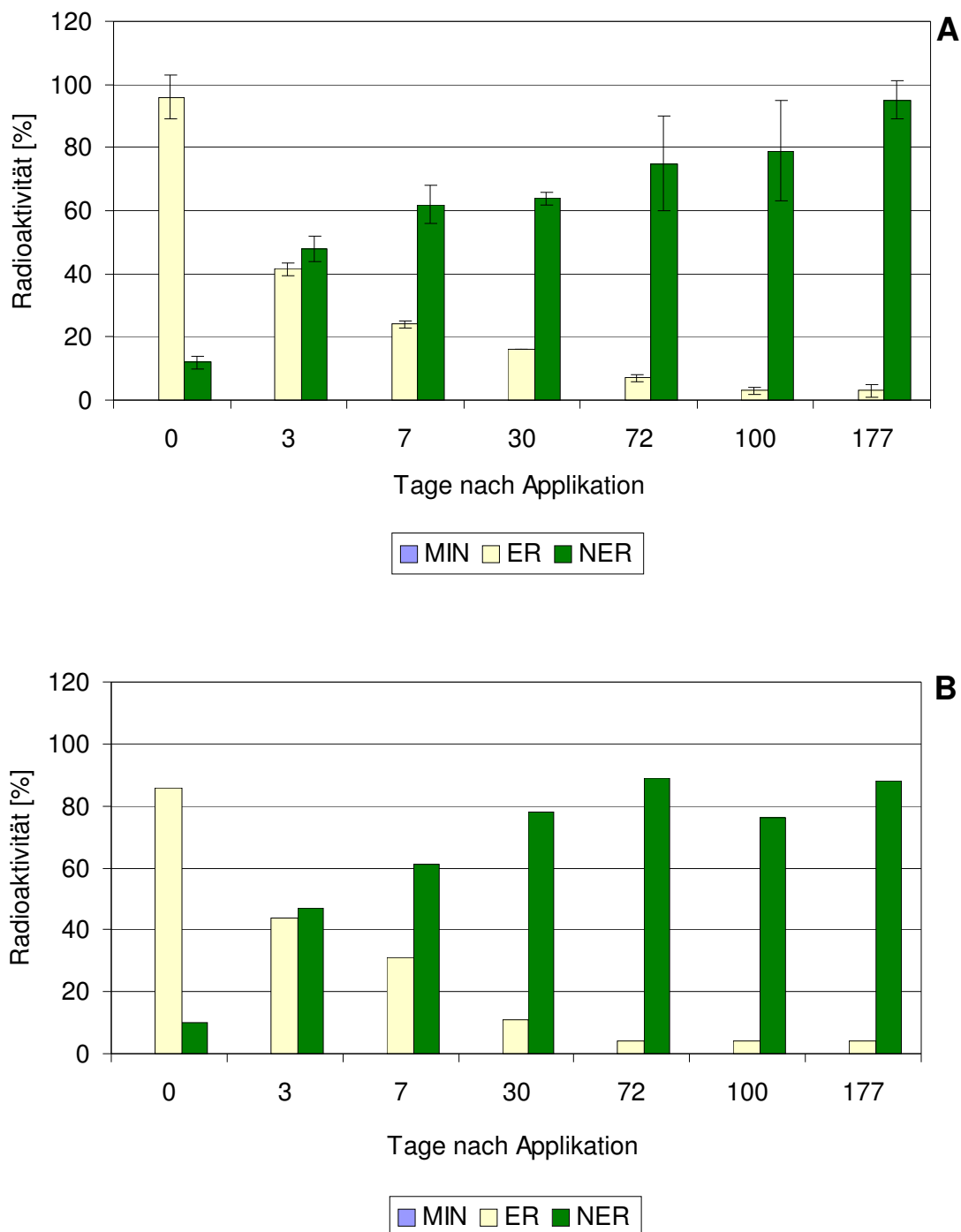
##### 4.4.1 Rückstandsdynamik von $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle

In dem ersten Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle nahm der Anteil der extrahierbaren Rückstände (ER) während der 177-tägigen Inkubation von 96 % auf 3 % der applizierten Ausgangsaktivität kontinuierlich ab. Parallel dazu nahm der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände (NER) von 12 % auf 95 % zu (**Abb. 10A**). Hier spiegelt sich die hohe Affinität des Sulfamethoxazols zur Güllematrix wider. Über die gesamte Inkubationsdauer konnte keine Mineralisation (MIN) oberhalb der Bestimmungsgrenze ermittelt werden.

Etwa ein Jahr später wurde der Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle unter den gleichen Inkubationsbedingungen wiederholt, wobei die Referenzgülle aus den gleichen Exkrementen hergestellt wurde, welche über diesen Zeitraum bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. In diesem zweiten Ansatz wurde mit 73270 Bq je 100 g Gülle (entspricht  $1250\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle) etwa die doppelte Konzentration Radiotracer appliziert als im ersten Ansatz mit 32650 Bq (entspricht  $560\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle), um ein Metaboliten-Screening durchführen zu können. Aufgrund der begrenzten Kapazität bedingt durch die hohe Gesamtprobenzahl im Gülleprojekt musste hier auf eine Doppelbestimmung verzichtet werden.

Die in **Abb. 10B** dargestellten Ergebnisse des zweiten Stabilitätstests zeigen deutlich, dass unter Verwendung der gleichen Güllematrix die Untersuchung des Abbauverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazols in Rindergülle unter Einsatz der beschriebenen Methoden reproduzierbar durchzuführen war. Ein Einfluss der höheren Aufwandmenge auf das Rückstandsverhalten der eingesetzten Substanz war anhand der Ergebnisse nicht erkennbar. Im Wiederholungsansatz nahm der Anteil der extrahierbaren Rückstände über einen Zeitraum von 177 Tagen von 86 auf 4 % ab. Parallel dazu stieg der Anteil der nicht-

extrahierbaren Rückstände von 10 auf 88 % an. Es konnten auch im zweiten Stabilitäts-test weder eine relevante Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze noch weitere volatile Verbindungen nachgewiesen werden.



**Abb. 10: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1) A: 1. Ansatz 2005 (n = 2), B: 2. Ansatz 2006 (n = 1)**

Ein abweichendes Rückstandsverhalten konnte von Höltge (2005) im Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle, welche aus einem Gülletank entnommen wurde, nachgewiesen werden. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit konnte hier nach 7-tägiger Inkubation mit 50 % ein höherer Anteil der applizierten Ausgangsaktivität extrahiert werden, wobei im Folgenden eine deutlich schnellere Abnahme der extrahierbaren Rückstände auf 2 % nach 30 Tagen erfolgte. Die von Höltge (2005) verwendeten Rindergülematrizes wiesen einen durchschnittlichen Trockensubstanzgehalt von 12 % und einem pH-Wert von 7.5 auf. Eine weitergehende Güllecharakterisierung erfolgte nicht, so dass eine mögliche Ursache für das differente Rückstandsverhalten der Substanz in einer unterschiedlichen Matrixzusammensetzung determiniert sein könnte. Hier zeigt sich die Notwendigkeit einer umfassend charakterisierten Referenzgülle zur Durchführung reproduzierbarer Abbauuntersuchungen bzw. zur Diskussion abweichender Ergebnisse aufgrund der Matrixzusammensetzung der Lagerzeit der Gülle vor dem Einsatz im Labortest sowie möglicherweise enthaltenen Fremdstoffen wie z.B. Reinigungs-, Desinfektionsmitteln. Das in den Extrakten des zweiten Stabilitätstests durchgeführte Metaboliten-Screening unter Verwendung von Ethylacetat als Laufmittel konnte lediglich bis Tag 7 in die Auswertung einbezogen werden, da die Extrakte ab einer Inkubation von 30 Tagen eine zu geringe Aktivität aufwiesen. An Tag 0 konnte noch 67 % der applizierten Ausgangsaktivität als Sulfamethoxazol identifiziert werden (**Tab. 24**).

**Tab. 24: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol (SMZ) in Rindergülle (RG-1; 2. Ansatz; n = 1)**

	<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	<b>Tage nach Applikation</b>						
		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>100</b>	<b>177</b>
<b>SMZ [%]</b>	0.82	67	7	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Σ MET<sup>1</sup> [%]</b>	---	19	37	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Laufmittel: Ethylacetat; MET<sup>1</sup>: Metaboliten; eingesetzt: 1250 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

Nach 7 Tagen entfielen mit 75 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle nur noch 6 % auf die unveränderte Ausgangsverbindung und 25 % auf nicht identifizierte Metaboliten<sup>1</sup>. Dieses Ergebnis bestätigte sich durch das zweite Laufmittel Chlorform/n-Butanol (8:1), wobei an

<sup>1</sup> In der vorliegenden Arbeit werden die auftretenden Metaboliten nicht differenziert, sondern zusammenfassend betrachtet und zur Bilanzierung herangezogen.

Tag 0 72 % und nach 7 Tagen 4 % der applizierten Ausgangsaktivität als unverändertes  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol identifiziert werden konnten (siehe Anhang, **Tab. A8**). Eine Berechnung des  $\text{DT}_{50}$ -Wertes war für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle nicht möglich.

Zur Untersuchung der Extraktionseffizienz wurden ausgewählte  $^{14}\text{C}$ -Sulfonamid-Rückstände in Gülleproben nach der Extraktion mit Ethylacetat einer weiteren Extraktion mit salzsaurem Methanol unterzogen. Unter diesen, aufgrund der Säure, reaktivierten Extraktionsbedingungen konnten aus den Güllerückständen der 100-Tage-Proben zusätzlich 6 und 15 % der applizierten Ausgangsaktivität extrahiert werden (**Tab. 25**).

**Tab. 25: Bilanz ausgewählter  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände aus Rindergülle (RG-1) nach Nachextraktion mit salzsaurem Methanol (MeOH/HCl)**

	72-tägige Inkubation		100-tägige Inkubation	
	SMZ <sup>1</sup>	SMZ <sup>2*</sup>	SMZ <sup>1</sup>	SMZ <sup>2*</sup>
<b>MIN</b> [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER<sub>EtAc</sub></b> [%]	7 ± 1	4	3 ± 1	4
<b>ER<sub>MeOH/HCl</sub></b> [%]	13 ± 5	4	15 ± 1	6
<b>NER</b> [%]	56 ± 1	73	40 ± 0	74
<b>Bilanz</b> [%]	<b>75</b>	<b>81</b>	<b>57</b>	<b>84</b>

<sup>1</sup>: erster Ansatz; <sup>2</sup>: zweiter Ansatz; \* n=1; EtAc: Ethylacetat-Extraktion

Die Bilanz von 57 % nach Nachextraktion der  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände in den 100-Tage-Proben des ersten Ansatzes spiegelt die Schwierigkeit der Filtration der Methanol-Extrakte aufgrund der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen vollständigen Vermischung von Güllematrix und Lösungsmittel wider. So wurde versucht, die Extrakte des ersten Ansatzes abzunutschen, wodurch jedoch keine befriedigende Aufreinigung erreicht werden konnte. Nach dem Abnutschen wurde der Extrakt zusätzlich zweimal filtriert. Aufgrund der durch diese Methode erreichten niedrigen Bilanz wurden die Methanolextrakte im Folgenden über ca. 8 Stunden mittels Faltenfilter abfiltriert, wodurch Bilanzen von 75 bis 84 % erreicht werden konnten. Da für die 100-Tage-Proben keine weiteren Rückstände zur Verfügung standen, um die Untersuchung zu wiederholen, wurde hier die 72-Tage-Probe zusätzlich nachextrahiert. Auch hier ließen sich 13 % der applizierten Ausgangsaktivität durch das salzsaure Methanol extrahieren. Aus dem Extraktionsrückstand der 72-Tage-Probe des zweiten Stabilitätstests konnten durch die salzsaure Nachextraktion 4 % der nicht-extrahierbaren Rückstände nach Ethylacetat-Extraktion freigesetzt werden.

Im Vergleich hierzu konnte Hölftge (2005) für die Nachextraktion von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände aus Rindergülle eine Bilanz von 107 % erreichen. Ursache für diese deutlich

bessere Bilanz könnte ein geringerer Matrixeffekt sein, da in diesen Untersuchungen jeweils 50 g Gülle für die Stabilitätstests verwendet wurden.

Um Veränderungen der Matrix während der Lagerung aufzeigen zu können, wurden parallel zu den Stabilitätstests Matrixcharakterisierungstests inkubiert und einer anschließenden Charakterisierung unterzogen (**Tab. 26**). Zur Kontrolle der Beeinflussung der Güllematrix durch die Testsubstanz bzw. das verwendete Standard-Lösungsmittel wurden für den ersten Ansatz zwei weitere Matrixcharakterisierungstests inkubiert. Hierbei handelte es sich zum einen um Referenzgülleproben ohne jeglichen Zusatz, zum anderen um Referenzgülleproben, zu welchen jeweils 50 µL des Lösungsmittels Acetonitril dotiert wurde (siehe Anhang, **Tab. A9** und **Tab. A10**).

**Tab. 26: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1; 1. Ansatz)**

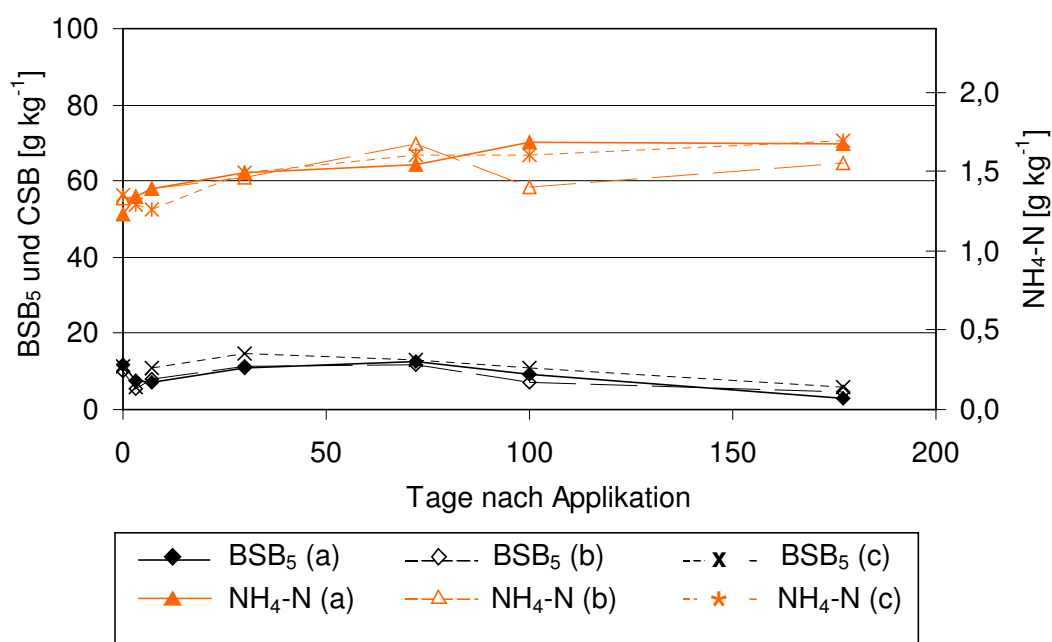
Parameter	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>TS</b> [%]	11	10	10	10	9	10	9
<b>TOC</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	36	42	36	48	40	37	37
<b>pH</b>	7.1	6.4	6.1	6.1	7.5	7.5	7.7
<b>Eh</b> [mV]	100	140	130	50	60	60	-80
<b>O<sub>2</sub></b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	1.2	1.3	1.4	1.5	1.5	1.7	1.7
<b>N<sub>total</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	3.4	3.6	3.4	3.8	3.5	3.5	3.2
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5
<b>BSB<sub>5</sub></b> [g kg <sup>-1</sup> ]	12	7.4	7.1	11	13	9.1	3.0
<b>CSB</b> [g kg <sup>-1</sup> ]	61	68	81	65	83	74	49

eingesetzt 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

Zwischen den 3 Varianten gab es über einen Zeitraum von 177 Tagen keine relevanten Unterschiede. In allen Matrixcharakterisierungstests lagen mit einem Redoxpotential < +150 mV und einem Sauerstoff-Gehalt < 0.1 mg kg<sup>-1</sup> konstant anaerobe Milieubedingungen vor. Unter den vorherrschenden anaeroben Bedingungen konnte im Stabilitätstest von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in Rindergülle keine relevante Mineralisation bzw. Freisetzung weiterer volatiler Verbindungen festgestellt werden.

Der biologische Sauerstoffbedarf, als Indikator für die mikrobielle Aktivität der Gülle, nahm in den 3 Matrixcharakterisierungstests von durchschnittlich 11 ± 1 auf 4.6 ± 1.5 g kg<sup>-1</sup> ab

(Abb. 11), wobei die Gülle über den gesamten Zeitraum von 177 Tagen mikrobiell aktiv blieb. Die deutlichste Abnahme des biologischen Sauerstoffbedarfs erfolgte in allen Tests zwischen Tag 100 und Tag 177. Der Ammonium-Stickstoff-Gehalt wies mit einer Zunahme von  $1.3 \pm 0.1$  auf  $1.6 \pm 0.1 \text{ g kg}^{-1}$  auf einen geringen Abbau der in der Gülle enthaltenen organischen Substanz hin. Der pH-Wert nahm bis 30 Tage nach Inkubationsbeginn von  $7.2 \pm 0.2$  auf  $6.1 \pm 0.1$  ab (Abb. 12). Zwischen Tag 7 und Tag 30 war eine pH-Wert-Zunahme auf  $7.5 \pm 0.2$  an Tag 177 zu beobachten. Alle weiteren Parameter blieben während der 177-tägigen Inkubation weitgehend unverändert.

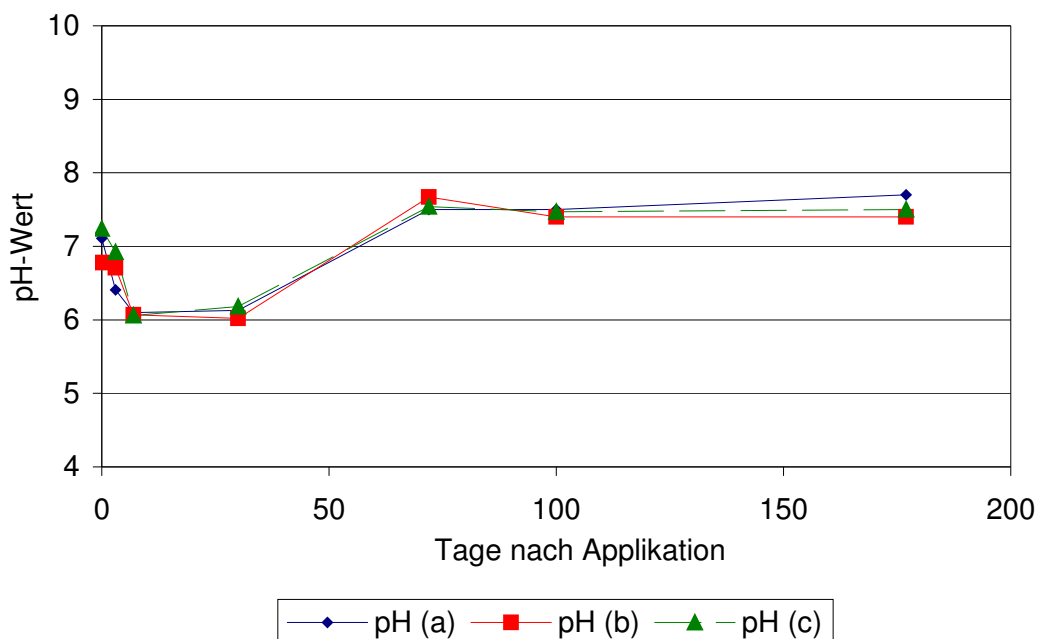


a: unmarkiertes Sulfamethoxazol ( $560 \mu\text{g Sulfamethoxazol kg}^{-1}$ ); b: ohne jeglichen Zusatz; c: mit Lösungsmittelzusatz ( $500 \mu\text{L Acetonitril kg}^{-1}$ )

**Abb. 11: Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB<sub>5</sub>) und Ammonium-Stickstoff-Gehalt (NH<sub>4</sub>-N) während der Matrixcharakterisierungstests in Rindergülle (RG-1; 2005)**

Insgesamt war zwischen den drei Matrixcharakterisierungstests kein relevanter Unterschied in der Zusammensetzung der Güllematrizes zu erkennen. Damit konnte ein Einfluss des Lösungsmittels bzw. der Testsubstanz Sulfamethoxazol auf die Zusammensetzung der Matrix während der Inkubation ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit in allen Stabilitätstests ausschließlich Matrixcharakterisierungstests mit unmarkierter Testsubstanz zur detaillierten Matrixcharakterisierung über die gesamte Inkubationsdauer herangezogen.





a: unmarkiertes Sulfamethoxazol ( $560 \mu\text{g Sulfamethoxazol kg}^{-1}$ ); b: ohne jeglichen Zusatz; c: mit Lösungsmittelzusatz ( $500 \mu\text{L Acetonitril kg}^{-1}$ )

**Abb. 12: pH-Werte während der Matrixcharakterisierungstests in Rindergülle (RG-1; 2005)**

Die im Rahmen des zweiten Stabilitätstests durchgeführten Matrixcharakterisierungstests wiesen mit einem Redoxpotential  $< +150 \text{ mV}$  und einem Sauerstoff-Gehalt  $< 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  ebenfalls auf die Einhaltung anaerober Milieubedingungen über die gesamte Inkubation hin (**Tab. 27**). Zur Qualitätssicherung wurde der Matrixcharakterisierungstests der 177-Tage-Probe in Doppelbestimmung durchgeführt. Der Vergleich der beiden 177-Tage-Proben (177.I und 177.II) zeigte eine hohe Übereinstimmung der aufgenommenen Parameter.

Der biologische Sauerstoffbedarf sowie der pH-Wert folgten über 177 Tage einem ähnlichen Verlauf wie in den Matrixcharakterisierungstests des ersten Stabilitätstests. So nahm der biologische Sauerstoffbedarf von 10 bzw.  $12 \text{ g kg}^{-1}$  an Tag 3 auf  $1.7 \text{ g kg}^{-1}$  ab, wobei auch hier die deutlichste Abnahme zwischen Tag 100 und Tag 177 erfolgte. Für den pH-Wert war bis zu Tag 30 eine Abnahme von 7.1 auf 6.6 sowie eine anschließende pH-Wert-Erhöhung auf 8.0 bzw. 7.9 an Tag 177 zu beobachten. Anhand des organischen Kohlenstoff-Gehalts und des Ammonium-Stickstoff-Gehalts konnten mit  $38 \pm 2 \text{ g kg}^{-1}$  bzw.  $1.4 \pm 0.1 \text{ g kg}^{-1}$  keine Hinweise auf während der Inkubation in der Gülle ablaufende Um-

setzungsprozesse festgestellt werden. Auch der Gesamt-Stickstoff-Gehalt blieb mit  $3.3 \pm 0.1 \text{ g kg}^{-1}$  über die gesamte Inkubationsdauer von 177 Tagen stabil.

**Tab. 27: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1; 2. Ansatz)**

Parameter	Tage nach Applikation							
	0	3	7	30	72	100	177.I	177.II
<b>TS [%]</b>	10	10	10	9	10	9	8	9
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	33	40	38	40	37	36	39	40
<b>pH</b>	7.1	7.0	6.7	6.6	6.9	7.5	8.0	7.9
<b>Eh [mV]</b>	-140	-100	20	-100	-20	-70	-200	-190
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.4	1.5	1.3	1.3	1.6	1.4	1.3	1.3
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.3	3.4	3.2	3.2	3.2	3.3	3.4	3.3
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	10	12	8.8	8.6	9.1	8.2	1.7	1.7
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	79	73	94	92	87	90	76	62

eingesetzt 1250 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

#### 4.4.2 Rückstandsdynamik von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in Schweinegülle

<sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol zeigte in Schweinegülle ein deutlich anderes Rückstandsverhalten als in Rindergülle. So erfolgte in Schweinegülle eine wesentlich langsamere Abnahme der extrahierbaren Rückstände über 177 Tage von 102 % auf 21 % (**Abb. 13A**). Verbunden mit der Abnahme der extrahierbaren Rückstände war auch hier eine Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände. Ab Tag 72 war im Stabilitätstests von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in Schweinegülle keine relevante Veränderung der Rückstandssituation mehr zu erkennen. Eine relevante Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze ließ sich auch in Schweinegülle nicht nachweisen.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden im Stabilitätstest von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in Schweinegülle ausgewählte Ansätze wiederholt. Sowohl nach 3-tägiger als auch nach 7-tägiger Inkubation zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit mit

$64 \pm 5$  % extrahierbaren und  $38 \pm 6$  % nicht-extrahierbaren Rückständen (**Tab. 28**) bzw.  $46 \pm 3$  % extrahierbaren und  $55 \pm 3$  % nicht-extrahierbaren Rückständen (**Tab. 29**).

**Tab. 28: Test zur Reproduzierbarkeit der 3-Tage-Ansätze von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle**

	Stabilitätstest		Wiederholung		Ø
	I	II	I	II	
<b>MIN [%]</b>	n.u.	n.u.	< 0.1	n.d.	n.b.
<b>ER [%]</b>	69	63	64	58	$64 \pm 5$
<b>NER [%]</b>	33	33	46	41	$38 \pm 6$
<b>Bilanz [%]</b>	<b>102</b>	<b>96</b>	<b>110</b>	<b>99</b>	<b><math>102 \pm 6</math></b>

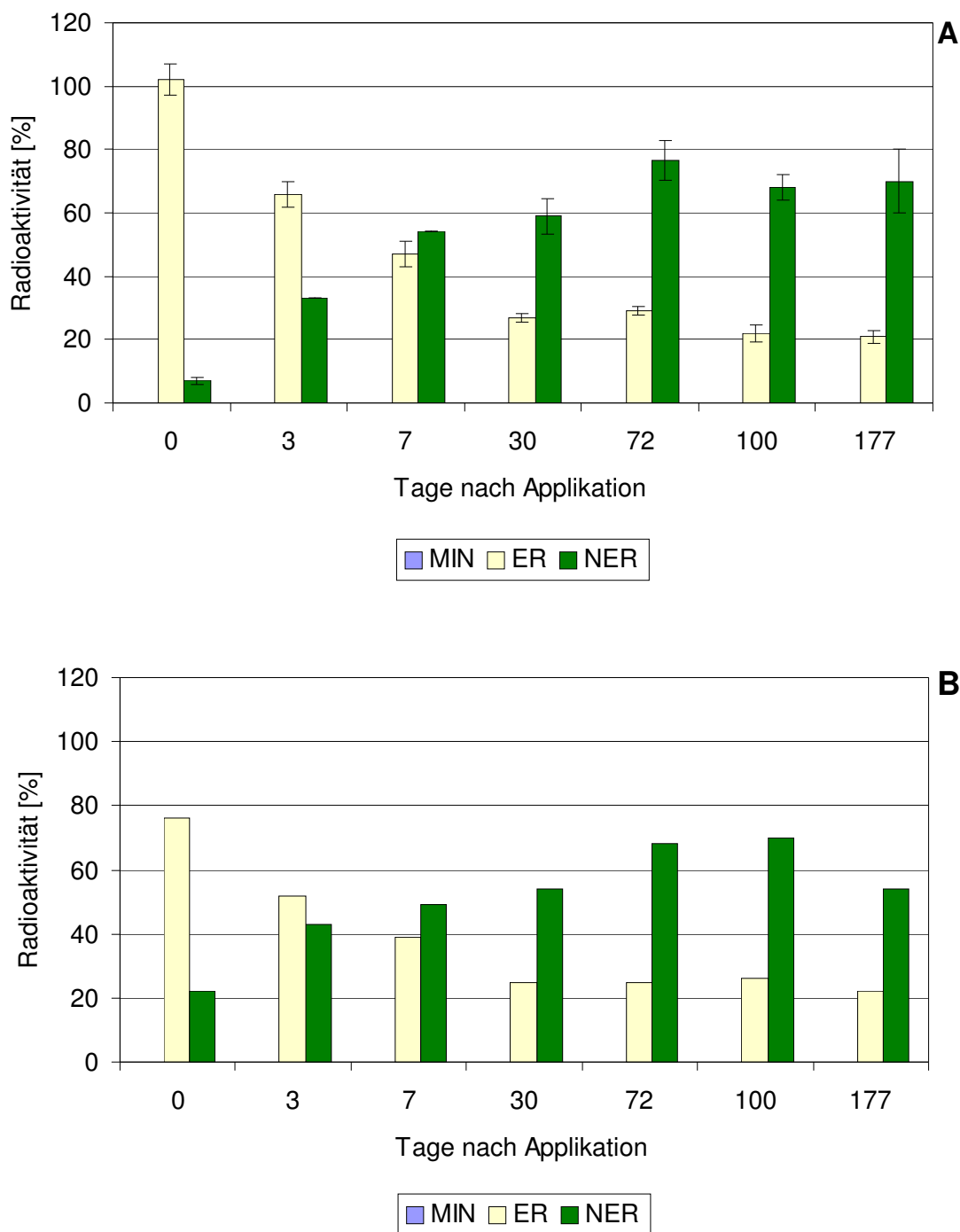
n.d.: nicht detektiert; n.u.: nicht untersucht; n.b.: nicht bestimmbar; eingesetzt:  $560 \mu\text{g}$  Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle

**Tab. 29: Test zur Reproduzierbarkeit der 7-Tage-Ansätze von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle**

	Stabilitätstest		Wiederholung		Ø
	I	II	I	II	
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	50	44	45	45	$46 \pm 3$
<b>NER [%]</b>	54	54	54	59	$55 \pm 3$
<b>Bilanz [%]</b>	<b>104</b>	<b>98</b>	<b>99</b>	<b>104</b>	<b><math>101 \pm 3</math></b>

eingesetzt:  $560 \mu\text{g}$  Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle

Analog zum zweiten Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle wurde auch der Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle ein Jahr später mit der selben Schweinegülle unter gleichen Inkubationsbedingungen wiederholt. Im zweiten Stabilitätstest wurden mit  $73270 \text{ Bq}$  je  $100 \text{ g}$  Gülle (entspricht  $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle) ebenfalls etwa die doppelte Menge Radiotracer appliziert als im ersten Ansatz mit  $32650 \text{ Bq}$  (entspricht  $560 \mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle), um ein Metaboliten-Screening durchführen zu können. Auch hier wurde auf eine Doppelbestimmung verzichtet.



**Abb. 13: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1) A: 1. Ansatz 2005 (n = 2), B: 2. Ansatz 2006 (n = 1)**

Im zweiten Ansatz von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle zeigte sich eine ähnliche Rückstandsdynamik wie im ersten Ansatz. Auch hier nahm über die gesamte Inkubation

der Anteil der extrahierbaren Rückstände nicht unter 20 % der applizierten Ausgangsaktivität ab (**Abb. 13B**). Anhand der extrahierbaren Rückstände ließ sich auch im zweiten Ansatz von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle ab Tag 72 keine relevante Veränderung der Rückstandssituation mehr erkennen, wobei nach Tag 72 und Tag 100 Bilanzen von 93 bzw. 96 % erreicht werden konnten. Im Fall des 177 Tage-Ansatzes konnte mit 76 % keine befriedigende Bilanz erreicht werden, ohne das der Bilanzverlust aufgeklärt werden konnte.

Bei dem in den Extrakten des zweiten Stabilitätstests durchgeführten Metaboliten-Screening unter Verwendung von Ethylacetat als Laufmittel ließen sich an Tag 0 noch 71 % der applizierten Ausgangsaktivität als Sulfamethoxazol identifizieren (**Tab. 30**). Nach 7 Tagen entfielen noch 18 % auf die unveränderte Ausgangsverbindung sowie 22 % auf nicht identifizierte Metaboliten. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Tagen konnte kein Sulfamethoxazol mehr identifiziert werden. Dieses Ergebnis bestätigte sich durch das mit dem zweiten Laufmittel Chlorform/n-Butanol (8:1) durchgeführte Metaboliten-Screening (siehe Anhang, **Tab. A13**). Nach Timme et al. (1986) konnte für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 3 Tagen berechnet werden.

**Tab. 30: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol (SMZ) in Schweinegülle (SG-1; 2. Ansatz; n=1)**

	$R_f$ -Wert	Tage nach Applikation						
		0	3	7	30	72	100	177
<b>SMZ [%]</b>	0.82	71	36	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Σ MET [%]</b>	---	5	17	22	25	25	26	22

Laufmittel: Ethylacetat; n.d.: nicht detektiert; MET: Metaboliten; eingesetzt:  $1250 \mu\text{g Sulfamethoxazol kg}^{-1}$  Gülle

Boxall et al. (2004) ziehen zur Beurteilung der Persistenz von Tierarzneimitteln in Gülle eine Methode zur Bewertung der Persistenz von Pestiziden nach Hollis (1991) heran. Nach dieser Methode werden Substanzen mit einem  $\text{DT}_{50}$ -Wert < 5 Tagen als nicht persistent, mit  $\text{DT}_{50}$ -Werten von 5 bis 21 Tagen als wenig persistent, von 22 bis 60 Tage als mäßig persistent und  $\text{DT}_{50}$ -Werten > 60 Tagen als hoch persistent eingestuft. Danach wäre Sulfamethoxazol in Schweinegülle als nicht persistent anzusehen. Auf Grundlage der Persistenzkriterien zur Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln in Böden (BBA, 1998), wonach eine Substanz bei Bildung > 70 % nicht-extrahierbarer Rückstände sowie einer Mineralisation < 5 % in 100 Tagen als persistent anzusehen ist, wären diese Kriterien für

Sulfamethoxazol in Schweinegülle jedoch erfüllt. Demnach wäre Sulfamethoxazol in Schweinegülle als persistent anzusehen. Für die Beurteilung der Persistenz von Tierarzneimitteln in Gülle existiert bisher kein Bewertungssystem.

Aus den Schweinegülle-Rückständen nach Ethylacetat-Extraktion nach 100-tägiger Inkubation ließen sich durch die Nachextraktion mit salzsaurem Methanol mit 16 bis 28 % deutlich mehr Rückstände extrahieren als aus Rindergülle (**Tab. 31**). Auch hier konnte für den ersten Ansatz mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle mit 68 % aufgrund des Probenhandlings keine zufriedenstellende Bilanz erreicht werden. Aus der 72-Tage-Probe konnten 17 % bzw. 34 % der Rückstände freigesetzt werden. Auffallend ist hier, dass aus den Extraktionsrückständen des zweiten Stabilitätstests sowohl nach 100 als auch nach 72 Tagen etwa 50 % weniger Rückstände zusätzlich extrahiert werden konnten als aus den Rückständen des ersten Stabilitätstests. Die Ursache hierfür konnte nicht aufgeklärt werden.

Dennoch kann aufgrund der Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die Affinität der Sulfonamidrückstände zur Schweinegülle geringer ist als zur Rindergülle. Zu dem gleichen Schluss kommt auch Höltge (2005) für die Nachextraktion von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückständen mittels salzsaurem Methanol aus Rinder- und Schweinegülle.

**Tab. 31: Bilanz ausgewählter  $^{14}\text{C}$ -Sulfonamid-Rückstände aus Schweinegülle (SG-1) nach Nachextraktion mit salzsaurem Methanol (MeOH/HCl)**

	72-tägige Inkubation		100-tägige Inkubation	
	SMZ <sup>1</sup>	SMZ <sup>2*</sup>	SMZ <sup>1</sup>	SMZ <sup>2*</sup>
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER<sub>EtAc</sub> [%]</b>	29 ± 1	25	22 ± 3	26
<b>ER<sub>MeOH/HCl</sub> [%]</b>	34 ± 2	17	29 ± 2	16
<b>NER [%]</b>	21 ± 4	41	18 ± 2	36
<b>Bilanz [%]</b>	<b>84</b>	<b>83</b>	<b>68</b>	<b>78</b>

<sup>1</sup>: erster Ansatz; <sup>2</sup>: zweiter Ansatz; \* n=1; EtAc: Ethylacetat-Extraktion

In den parallel zu den Stabilitätstests inkubierten und Matrixcharakterisierungstests konnten für alle Ansätze anhand eines Redoxpotentials < +150 mV und eines Sauerstoff-Gehalts < 0.1 mg kg<sup>-1</sup> konstant anaerobe Milieubedingungen aufgezeigt werden (**Tab. 32** und **Tab. 33**).

**Tab. 32: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1; 1. Ansatz)**

Parameter	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>TS [%]</b>	4	4	4	5	4	5	4
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	20	17	18	18	18	21	16
<b>pH</b>	7.4	7.2	7.5	7.5	7.6	7.7	7.9
<b>Eh [mV]</b>	30	0	-30	50	-40	-180	-180
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.9	2.0	1.9	2.2	2.0	1.9	1.9
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.1	3.0	3.0	3.3	3.0	2.9	2.9
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	9.6	13	8.8	10	8.2	1.8	0.02
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	31	29	32	29	29	21	16

eingesetzt 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. 33: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1; 2. Ansatz)**

Parameter	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>TS [%]</b>	3	4	6	4	4	4	4
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	23	18	14	20	18	20	21
<b>pH</b>	7.9	7.9	7.5	7.5	7.7	7.7	8.0
<b>Eh [mV]</b>	-240	-250	-240	-170	-60	-220	-240
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	2.0	2.1	2.0	1.9	1.9	2.0	2.0
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.0	3.0	3.2	3.3	3.1	3.1	3.3
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	6.7	8.1	8.1	7.2	6.9	3.6	2.4
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	47	41	41	40	37	24	23

eingesetzt: 1250 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

Der biologische Sauerstoffbedarf zeigte in den parallel zum ersten Stabilitätstest durchgeführten Matrixcharakterisierungstests eine deutliche Abnahme von 8.2 auf 1.8 g kg<sup>-1</sup> zwi-

schen Tag 72 und 100. Bis Tag 177 nahm der biologische Sauerstoffbedarf weiter bis auf  $0.02 \text{ g kg}^{-1}$  ab. Dies wies auf eine relevante Hemmung der in der Gülle enthaltenen aeroben Mikroorganismen hin. In den Matrixcharakterisierungstests parallel zum zweiten Stabilitätstest konnte ebenfalls eine Abnahme des biologischen Sauerstoffbedarfs festgestellt werden, wobei nach 177 Tagen ein Wert von  $2.4 \text{ g kg}^{-1}$  gemessen werden konnte. Aufgrund des organischen Kohlenstoff-Gehalts von durchschnittlich  $19 \pm 3 \text{ g kg}^{-1}$  und  $18 \pm 2 \text{ g kg}^{-1}$  sowie des Ammonium-Stickstoff-Gehalts mit  $2.0 \pm 0.1 \text{ g kg}^{-1}$  in den Matrixcharakterisierungstests beider Stabilitätstests kann davon ausgegangen werden, dass während der Inkubation kein Abbau der organischen Substanz in der Gülle statt fand.

#### 4.4.3 Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen

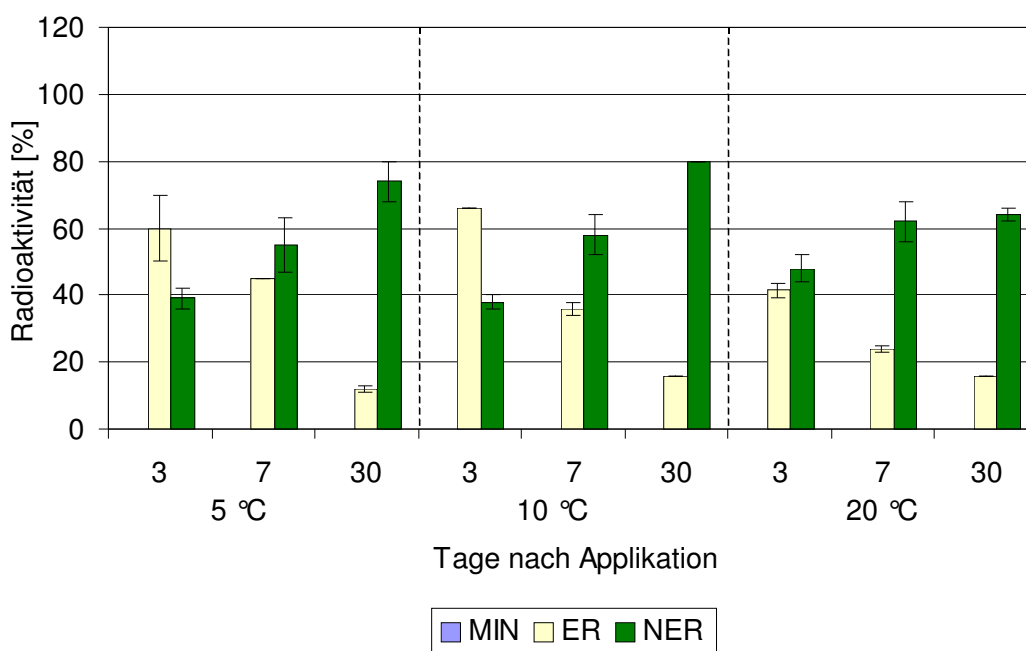
Gülle unterliegt während der Lagerung, anders als Festmist, in der Regel keiner Eigenerwärmung (ATV-DVWK, 2001). Die meisten Gülletanks und Silos befinden sich ober- oder unterirdisch außerhalb der Stallungen (Burton et al., 2003; Hüther, 1999). Damit ist die Temperatur der gelagerten Gülle von den vorherrschenden Außentemperaturen abhängig (Bouwman und Reus, 1994). Diese liegen laut dem Deutschen Wetterdienst (2005) im Jahresmittel bei  $9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Für die Niederlande geben Montforts und Tarazona Lafarga (2003) durchschnittliche Temperaturen von  $12$  und  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in Rinder- bzw. Schweinegülle an. Van Vlaardingen (2001) schlägt nach der von Montfort (1999) beschriebenen Methode eine Inkubationstemperatur von  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für Rindergülle und  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für Schweinegülle vor, ohne den Hintergrund hierfür weiter zu erläutern. Für eine bessere Vergleichbarkeit wäre jedoch eine Vereinheitlichung der Untersuchungs-Temperaturen für Rinder- und Schweinegülle zu empfehlen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stabilitätstests wurde in Anlehnung an Laboruntersuchungen mit Boden (BBA, 1986; OECD, 2002), grundsätzlich eine Inkubationstemperatur von  $20 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  verwendet, wie auch von Bouwman und Reus (1994) für Abbauuntersuchungen in Gülle vorgeschlagen. In Kurzzeittests bis zu einer Inkubationszeit von 30 Tagen wurden zusätzlich Inkubationstemperaturen von  $5$  und  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  untersucht.

Den in **Abb. 14** dargestellten Ergebnissen der Kurzzeittests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle bei Inkubationstemperaturen von  $5$  und  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden ergänzend Werte aus den Langzeittests bei  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gegenübergestellt. Der Vergleich der bei  $5$  und  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  erzielten Ergebnissen mit dem Stabilitätstest bei  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gibt einen Hinweis darauf, dass die



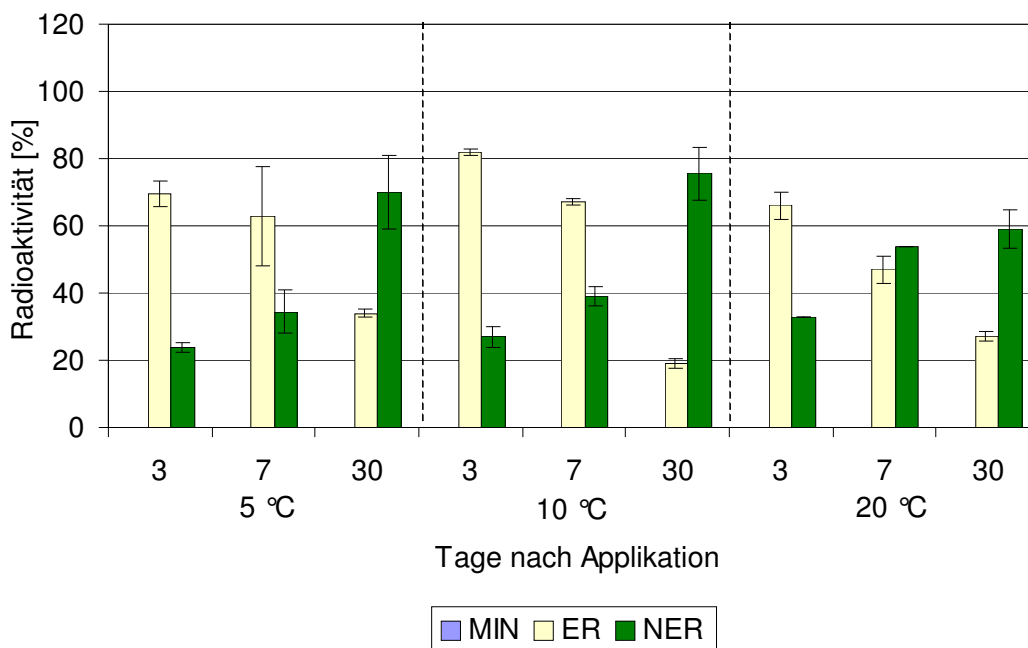
Abnahme der Extrahierbarkeit von Sulfamethoxazol in Rindergülle zu Beginn der Inkubation mit zunehmender Temperatur schneller erfolgt. So ließen sich bei 5 und 10 °C nach 3 Tagen 60 bzw. 66 % der applizierten Ausgangsaktivität extrahieren. Bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C waren nach 3 Tagen noch 42 % extrahierbar. Nach 7-tägiger Inkubation war der Unterschied zwischen den Temperaturvarianten mit einem Anteil von 45 und 36 % bei 5 und 10 °C und 24 % bei 20 °C bereits weniger deutlich. Nach 30 Tagen waren mit 12, 16 und 16 % extrahierbaren Rückstände keine relevanten Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten mehr zu erkennen.



**Abb. 14: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1) bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen**

Das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle zeigte bei Inkubationstemperaturen von 5 und 10 °C ebenfalls keine relevanten Unterschiede (**Abb. 15**). Bei beiden Temperaturvarianten überwog der Anteil der extrahierbaren Rückstände bis Tag 7 die nicht-extrahierbaren Rückstände. Nach einer Inkubation von 30 Tagen lag der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände mit 70 bzw. 76 % deutlich über dem der extrahierbaren Rückstände. Im Vergleich der Daten aus dem Langzeit-Stabilitätstest der bei 20 °C inkubierten Schweinegülle zeigte sich, dass die Abnahme der Extrahierbarkeit von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle mit zunehmender Temperatur ebenfalls schneller erfolgte. Bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C dominierte der Anteil der nicht-

extrahierbaren Rückstände bereits ab Tag 7 über den der extrahierbaren Rückstände (Abb. 13, Seite 76). Auch Harms (2006) konnte für Sulfamethoxazol bei 20 °C einen schnelleren Abbau der Substanz in Schweinegülle feststellen als im Vergleich zu Untersuchungen bei 7 °C. Nach einer Inkubationsdauer von 112 Tagen konnte hier für beide Temperaturvarianten mit einer Konzentrationsabnahme von 80 % kein Unterschied mehr nachgewiesen werden.

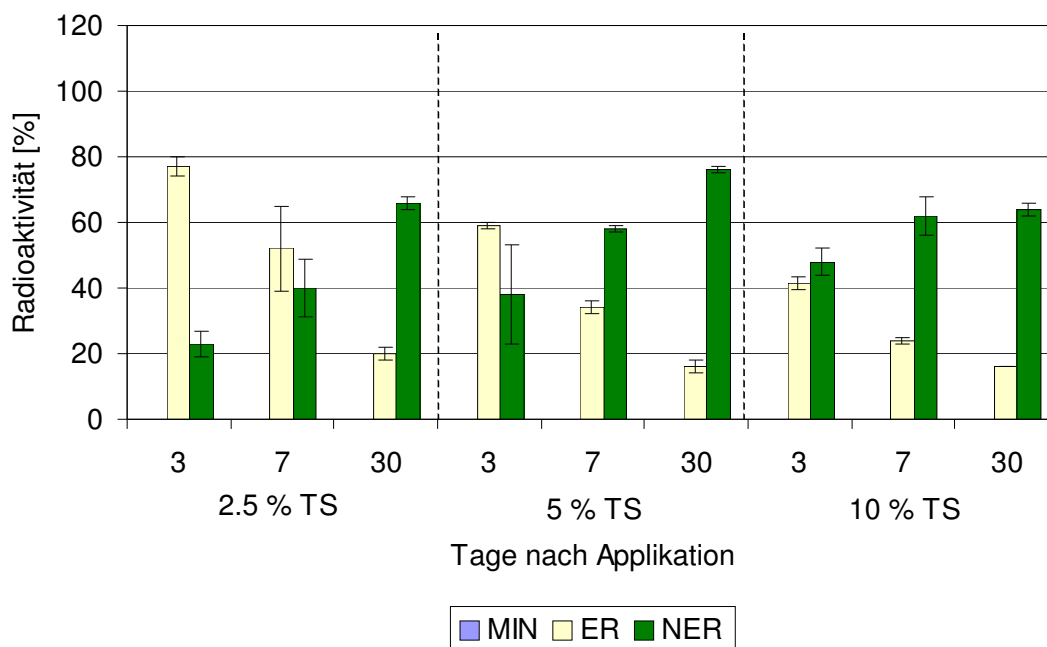


**Abb. 15: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1) bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen**

#### 4.4.4 Einfluss verschiedener Trockensubstanzgehalte

Gülle ist eine hochkomplexe, variable Matrix. Die Variabilität zeigt sich unter anderem in einem unterschiedlichen Trockensubstanzgehalt der Gülle. So wird in der Literatur ein Trockensubstanzgehalt von 0.4 und 12.3 % bzw. 0.4 und 11.6 % für Rinder- und Schweinegülle angegeben (Burton et al., 2003; Merkel, 2005) (vergleiche Tab. 2 und 3, Seite 6 und 7). Die für die Langzeittests ausgewählten Trockensubstanzgehalte von 10 % in Rindergülle und 5 % in Schweinegülle beruhten auf den durchschnittlich in der Literatur angegebenen Mittelwerten (ATV-DVWK, 2001; Merkel, 2005; Skark und Zullei-Seibert, 2001). Um den Einfluss des Trockensubstanzgehalts der Gülle auf das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol aufzuzeigen, wurden zusätzlich Kurzzeittests bis 30 Tage

bei einem Trockensubstanzgehalt von 2.5 und 5 % in Rindergülle und 2.5 und 10 % in Schweinegülle durchgeführt.

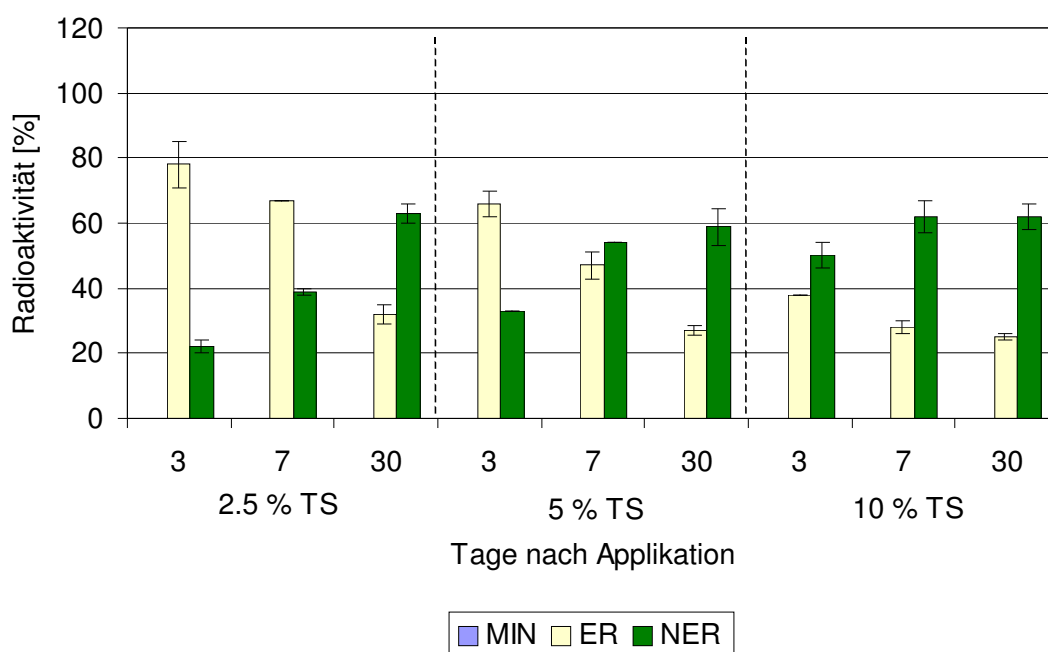


**Abb. 16: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1) bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten**

Aus den in **Abb. 16** dargestellten Ergebnissen lässt sich ablesen, dass die Abnahme der extrahierbaren Rückstände von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle mit zunehmendem Trockensubstanzgehalt in den ersten 7 Tagen der Inkubation schneller erfolgte. So lag bei einem Trockensubstanzgehalt von 5 % der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände bereits nach 7 Tagen deutlich über dem Anteil der extrahierbaren Rückstände. Im Vergleich der gegenübergestellten Daten aus dem Langzeittest mit einem Trockensubstanzgehalt von 10 % setzte sich diese Tendenz fort. Hier überwog der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände bereits nach 3-tägiger Inkubation über dem Anteil der extrahierbaren Rückstände. Nach 30-tägiger Inkubation waren mit einem Anteil von 20, 16 und 16 % extrahierbaren Rückständen keine relevanten Unterschiede zwischen den Trockensubstanzvarianten mit 2.5, 5 und 10 % mehr erkennbar.

Das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle wies bei unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt eine nahezu entsprechende Tendenz auf wie für Rindergülle beschrieben (**Abb. 17**). Auch hier konnte unter Einbeziehung der Ergebnisse

des Langzeittests bei Trockensubstanzgehalten von 5 % zu Beginn der Inkubation eine schnellere Abnahme der extrahierbaren Rückstände mit zunehmendem Trockensubstanzgehalt belegt werden. So dominierte bei einem Trockensubstanzgehalt von 10 % der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände bereits nach 3-tägiger Inkubation deutlich über den Anteil der extrahierbaren Rückstände. Bei einem Trockensubstanzgehalt von 5 % überwog der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände nach einer Inkubation von 7 Tagen. Nach 30-tägiger Inkubation konnte mit einem Anteil von 63, 59 bzw. 62 % nicht-extrahierbaren Rückständen kein wesentlicher Unterschied zwischen der Rückstandssituation bei Trockensubstanzgehalten von 2.5, 5 und 10 % in Schweinegülle mehr nachgewiesen werden.

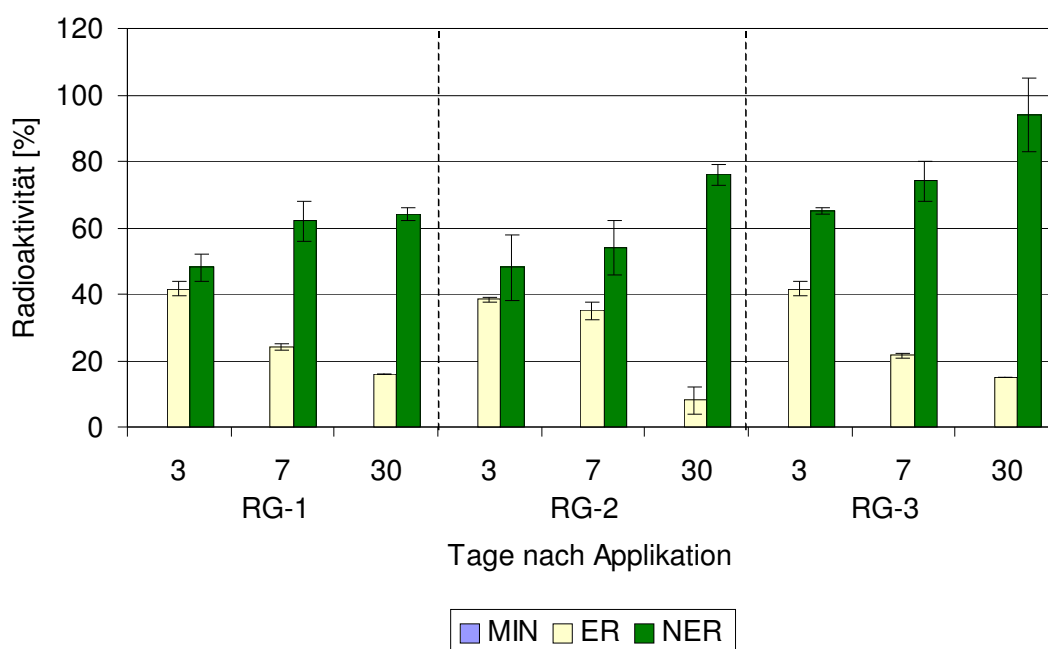


**Abb. 17: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1) bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten**

#### 4.4.5 Einfluss verschiedener Güllematrizes

Der Einfluss verschiedener Rinder- und Schweinegüllematrizes auf das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol wurde anhand von 2 Rinder- und Schweinegüllematrizes über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht. Die eingesetzten Rindermatrizes stammten von Tieren unterschiedlichen Alters sowie unterschiedlichen Fütterungsbedingungen. Die Güllematrix RG-2, welche aus Exkrementen eines 8 Monate alten Jungrinds herge-

stellt wurde, wies mit pH 8.1 einen etwas höheren pH-Wert auf als die im Langzeitstabilitätstest eingesetzte Gülle RG-1 mit pH 7.0. Auch der Ammonium-Stickstoff-Gehalt sowie der Gesamt-Stickstoffgehalt der Jungrindergülle lagen deutlich höher im Vergleich zu der Güllematrix RG-1 (vergleiche Kapitel 4.1.3, Seite 53). Die aus Exkrementen einer Milchkuh aus einem Milchviehbetrieb hergestellte Gülle RG-3 wies ebenfalls einen höheren pH-Wert von 8.0 sowie im Vergleich zur Güllematrix RG-1 einen höheren Ammonium-Stickstoff-Gehalt sowie Gesamt-Stickstoff-Gehalt auf. In Ergänzung zu den Daten aus den Kurzzeittests wurden in **Abb. 18** Werte aus den Langzeittests unter Verwendung der Güllematrix RG-1 aus Exkrementen einer 5-jährigen Milchkuh aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung gegenübergestellt.



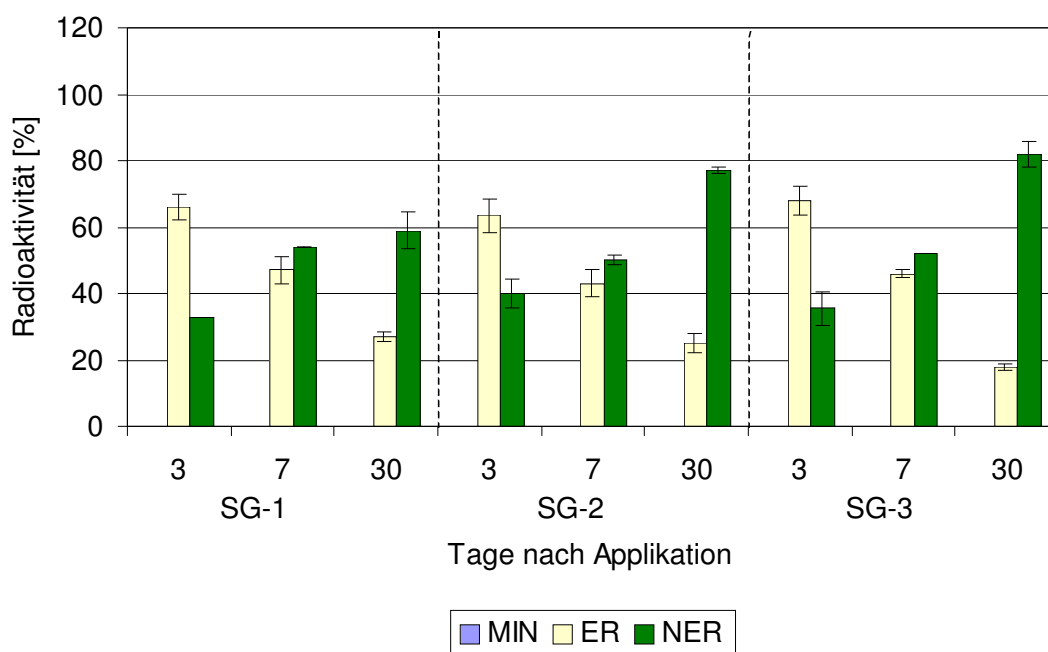
RG-1: 5-jährige Milchkuh aus Versuchsstall, RG-2: 8 Monate altes Jungrind aus Versuchsstall, RG-3: 5-jährige Milchkuh aus Milchviehbetrieb

**Abb. 18: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in verschiedenen Rindergüllematrizes (RG)**

Im Vergleich der Rückstandssituation von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in verschiedenen Güllematrizes war für alle drei Güllematrizes über 30 Tage eine Abnahme der extrahierbaren Rückstände zu beobachten, welche jeweils mit einer Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände verbunden waren. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen lag die Extrahierbarkeit des  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazols mit 42, 39 und 42 % in einem ähnlichen Bereich. Innerhalb von 7 Tagen erfolgte die Abnahme der extrahierbaren Rückstände in RG1 und RG-3 mit 24 bzw. 22 % schneller als in der Jungrindergülle RG-2 mit 38 %. Nach 30

Tagen ließen sich noch 16, 8 und 15 % der applizierten Ausgangsaktivität aus den drei Matrices extrahieren.

Die für die Untersuchung des Rückstandsverhaltens von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle eingesetzten Matrices stammen von Mastschweinen, welche unter unterschiedlichen Fütterungsbedingungen gehalten wurden. Die Schweingülle SG-2 wurde aus Exkrementen von Mastschweinen aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung hergestellt, welche jedoch mit einem höheren Weizenanteil von 50 % gefüttert wurden als üblich. Für die Herstellung der Gülle RG-3 wurden Exkremente von Tieren aus einem Schweinemastbetrieb verwendet, welche hauptsächlich mit Kartoffelabfällen gefüttert wurden (vergleiche Tab. 5, Seite 18). Zur Ergebnisgegenüberstellung wurden auch hier Werte aus den aus den Langzeitteststabilitätstests unter Verwendung der Gülle SG-1 aus Exkrementen von konventionell gefütterten Mastschweinen aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung herangezogen. Die Güllematrices SG-1 und SG-2 wiesen nur geringen Unterschiede in der Zusammensetzung auf. Die Schweingülle SG-3 wies im Vergleich einen geringeren pH-Wert von 5.8 sowie einen geringeren Ammonium-Stickstoff- und Gesamt-Stickstoff-Gehalt auf (vergleiche Tab. 16, Seite 55).



SG-1: Mastschweine aus Versuchsstall; SG-2: Mastschweine aus Versuchsstall, Fütterungsversuch mit erhöhtem Weizenanteil; SG-3: Mastschweine aus Mastbetrieb, Fütterung mit Kartoffelabfällen

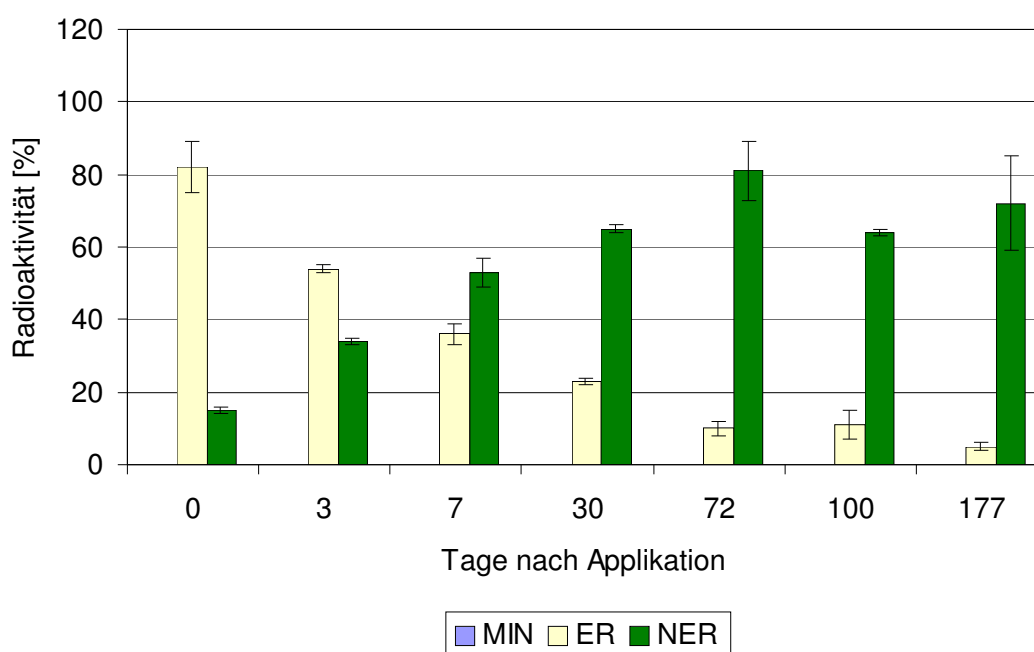
**Abb. 19: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in verschiedenen Schweinegüllematrices (SG)**

## 4.5 Stabilität von Acetyl-Sulfamethoxazol in Gülle

In weiteren Stabilitätstests wurde das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetyl-Sulfamethoxazol, dem in tierischen Organismus gebildeten Hauptmetaboliten des Sulfamethoxazols, in Rinder- und Schweinegülle untersucht. Parallel zu den Stabilitätstests wurden Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Acetyl-Sulfamethoxazol zur Charakterisierung der Güllematrix inkubiert.

### 4.5.1 Rückstandsdynamik von $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle

Das im Stabilitätstest über 177 Tage untersuchte  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol zeigte in Rindergülle eine ganz ähnliche Rückstandsdynamik wie Sulfamethoxazol. Über die gesamte Inkubation war eine kontinuierliche Abnahme der extrahierbaren Rückstände von 82 auf 5 % in 177 Tagen zu beobachten (**Abb. 20**).



**Abb. 20: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1)**

Verbunden mit der Abnahme der extrahierbaren Rückstände war eine zunehmende Festlegung der Substanz in der Güllematrix in Form nicht-extrahierbarer Rückstände, wobei sich bereits an Tag 0 15 % der Substanz nicht mehr extrahieren ließen. Über die gesamte Inkubationsdauer konnte keine Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. Durch die Nachextraktion mit salzsaurem Methanol ließen sich aus den

Gülle Rückständen der 100-Tage-Probe nach Ethylacetat-Extraktion zusätzlich  $9 \pm 1$  % der applizierten Ausgangsaktivität extrahieren.

Mittels des durchgeführten Metaboliten-Screenings in den Extrakten konnte aus der Tag-0-Probe unter Verwendung von Ethylacetat als Lösungsmittel 82 % der applizierten Ausgangsaktivität als  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol identifiziert werden (**Tab. 34**).

**Tab. 34: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ) in Rindergülle, Laufmittel Ethylacetat**

	$R_f$ -Wert	Tage nach Applikation						
		0	3	7	30	72	100	177
<b>A-SMZ [%]</b>	0.50	$82 \pm 7$	$37 \pm 3$	$12 \pm 1$	$3 \pm 1$	n.d.	n.d.	n.d.
<b>SMZ [%]</b>	0.82	n.d.	$4 \pm 0$	$3 \pm 2$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	n.d.	$13 \pm 2$	$21 \pm 1$	$20 \pm 1$	n.d.	n.d.	n.d.

eingesetzt:  $1380 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle; n.d.: nicht detektiert; MET: Metaboliten; SMZ: Sulfamethoxazol

Innerhalb von 30 Tagen nahm der Anteil des Acetyl-Sulfamethoxazols bis auf 3 % ab (entspricht  $41 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle). In den 3- und 7-Tage-Extrakten konnten zusätzlich 4 bzw. 3 %  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol bestimmt werden. Im Metaboliten-Screening unter Verwendung des zweiten Laufmittels Chloroform/n-Butanol (8:1) ließen sich in den 3- und 7-Tage-Extrakten 7 bzw. 4 %  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol nachweisen (**Tab. 35**).

**Tab. 35: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ) in Rindergülle (RG-1), Laufmittel: Chloroform/n-Butanol (8:1)**

	$R_f$ -Wert	Tage nach Applikation						
		0	3	7	30	72	100	177
<b>A-SMZ [%]</b>	0.42	$82 \pm 7$	$27 \pm 12$	$12 \pm 1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>SMZ [%]</b>	0.70	n.d.	$7 \pm 0$	$4 \pm 0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	n.d.	$12 \pm 1$	$20 \pm 1$	$23 \pm 0$	n.d.	n.d.	n.d.

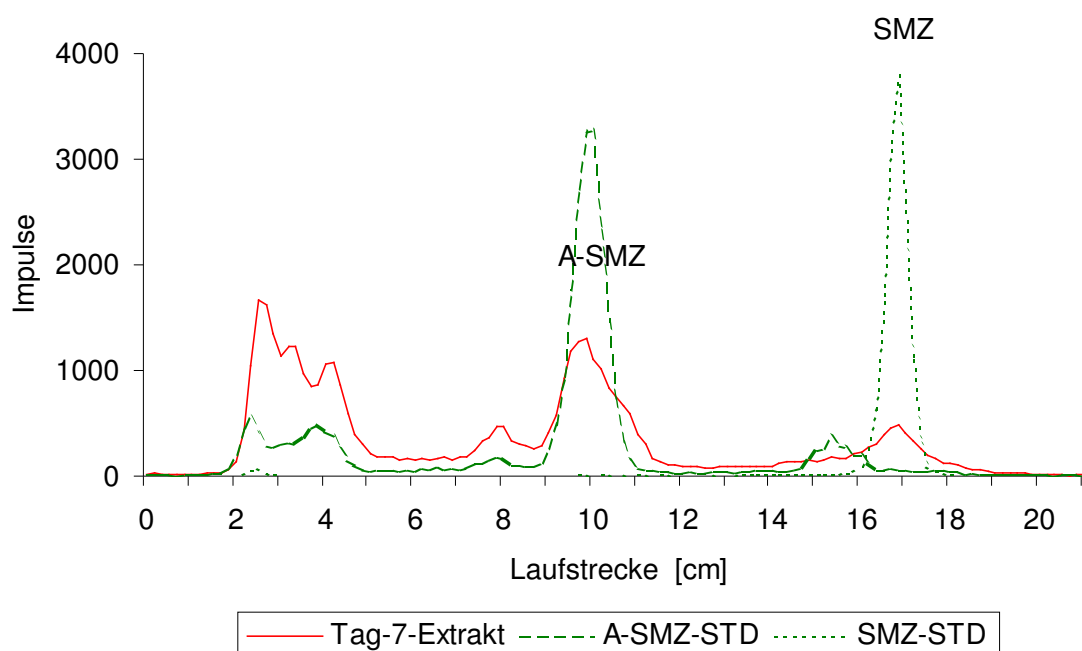
eingesetzt:  $1380 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle; n.d.: nicht detektiert; MET: Metaboliten; SMZ: Sulfamethoxazol



Nach 30 Tagen konnten hier  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol noch  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Aktivität und der daraus resultierenden Impulszahl  $< 150$  konnte das Metaboliten-Screening der 72-, 100- und 177-Tage-Extrakte nicht in die Auswertung einbezogen werden. Nach Timme et al. (1986) ließ sich für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 1 Tag und ein  $\text{DT}_{90}$ -Wert von 14 Tagen berechnen.

In **Abb. 21** ist exemplarisch das Chromatogramm eines 7-Tage-Extraktes dargestellt, im Vergleich zu einem  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol-Standard und einem  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Standard. Neben Acetyl-Sulfamethoxazol und Sulfamethoxazol konnten weitere Umwandlungsprodukte mit geringeren  $R_f$ -Werten detektiert werden, welche jedoch wie bereits erwähnt nicht identifiziert, sondern zusammengefasst als Metaboliten in die Radioaktivitätsverteilung einbezogen wurden.

Die Möglichkeit der Umwandlung acetylierter Hauptmetaboliten der Sulfonamid-Antibiotika in die therapeutisch aktive Ausgangsverbindung während der Gülle-Lagerung konnte bereits von einigen Autoren nachgewiesen werden (Berger, et al., 1986; Grote, 2005; Höltge, 2005; Höltge und Kreuzig, 2007; Langhammer, 1989).



**Abb. 21:** RTLC-Chromatogramm eines Extraktes aus dem Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1) nach 7-tägiger Inkubation

Auch im Rahmen des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle wurden parallel Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Acetyl-Sulfamethoxazol zur Charakterisierung der Güllematrix inkubiert, wobei hier zur Qualitätssicherung ebenfalls eine Doppelbestimmung der 177 Tage-Proben durchgeführt wurden (177.I und 177.II). Die Ergebnisse der Matrixcharakterisierung in **Tab. 36** lassen darauf schließen, dass die Güllematrizes nach einer Inkubation von 177 Tagen gemessen am biologischen Sauerstoffbedarf mit 2.4 bzw. 2.8  $\text{g kg}^{-1}$  noch mikrobiell aktiv war. Jedoch nahm auch hier, wie in den Matrixcharakterisierungstests des zweiten Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle, der biologische Sauerstoffbedarf über einen Inkubationszeitraum von 177 Tagen ab, wobei die deutlichste Abnahme zwischen Tag 72 und Tag 100 von 9.8 auf 2.3  $\text{g kg}^{-1}$  stattfand. Zwischen Tag 100 und Tag 177 konnte keine wesentliche Veränderung des biologischen Sauerstoffbedarfs mehr festgestellt werden. Gemessen am Sauerstoffgehalt  $< 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  und einem Redoxpotential  $< +150 \text{ mV}$  lagen während der gesamten Inkubation anaerobe Milieubedingungen vor. Auch hier konnte wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben eine pH-Wert-Abnahme bis Tag 30 und eine anschließende pH-Wert-Erhöhung bis Tage 177 beobachtet werden.

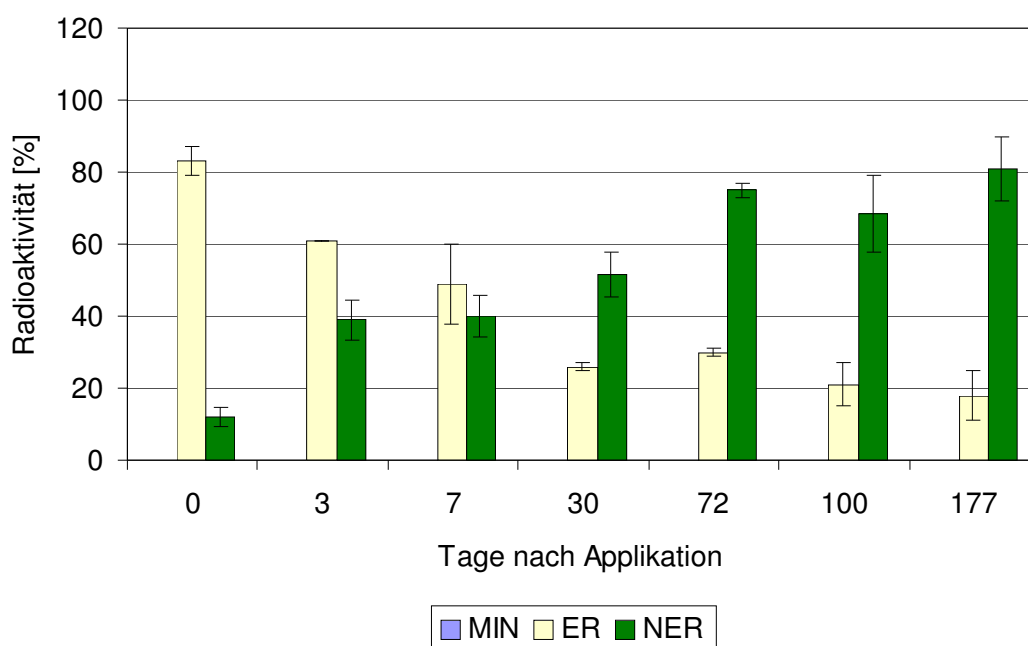
**Tab. 36: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1)**

Parameter	Tage nach Applikation							
	0	3	7	30	72	100	177.I	177.II
TS [%]	11	11	9	9	9	9	8	8
TOC [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	37	37	40	63	45	41	40	37
pH	7.4	6.8	6.8	6.6	7.1	7.4	7.6	7.6
Eh [mV]	-180	-170	-160	-80	-80	-100	-200	-220
$\text{O}_2$ [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$	$< 0.1$
$\text{NH}_4\text{-N}$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	1.3	1.5	1.4	1.2	1.4	1.5	1.2	1.0
$\text{N}_{\text{total}}$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.3	3.6	3.5
$\text{NH}_4\text{-N} / \text{N}_{\text{total}}$	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3
$\text{BSB}_5$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	7.9	9.8	9.2	9.4	9.8	2.3	2.8	2.4
$\text{CSB}$ [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	57	79	81	89	82	73	67	62

eingesetzt:  $1380 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle

#### 4.5.2 Rückstandsdynamik von $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Schweinegülle

Im Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Schweinegülle erfolgte eine zunehmende Festlegung der Substanz in Form nicht-extrahierbarer Rückstände von 12 auf 81 % in 177 Tagen (**Abb. 22**). Zwischen Tag 30 und Tag 177 war anhand der extrahierbaren Rückstände mit  $24 \pm 5$  % keine wesentliche Änderung der Rückstandssituation mehr zu erkennen. Ab Tag 72 konnte mit 0.1 % eine geringe Mineralisation bestimmt werden.



**Abb. 22:** Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1)

Das für die Ethylacetat-Extrakte aller Inkubationsintervalle durchgeführte Metaboliten-Screening ergab, dass in den Extrakten der 0-Tage-Probe der gesamte Anteil der extrahierbaren Aktivität auf das unveränderte  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol entfiel (**Tab. 37**). Anders als in Rindergülle konnten nach 7 Tagen lediglich in einem Ansatz 3 % des deacetylierten  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazols detektiert werden. In einem weiteren Metaboliten-Screening unter Verwendung des zweiten Laufmittels Chloroform/Butanol (8:1) konnten nach 3 bzw. 7 Tagen in jeweils beiden Extrakten Anteile von  $3 \pm 1$  % bzw.  $4 \pm 1$  % der Ausgangsverbindung nachgewiesen werden (**Tab. 38**). Nach 72 Tagen ließen sich in beiden Screening-Untersuchungen weder  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol noch  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in den Extrakten nachweisen. Auch Langhammer (1989) und Berger (1986) konnte eine Umwandlung von Acetyl-Sulfadimidin in die Ausgangsverbindung in Schweinegülle feststellen. Nach Timme et al. (1986) ließ sich für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-

Sulfamethoxazol in Schweinegülle ein  $DT_{50}$ -Wert von 6 Tagen sowie ein  $DT_{90}$ -Wert von 19 Tagen und damit eine geringere Abbaubarkeit der Substanz in Schweinegülle als in Rindergülle ermitteln. Durch die Nachextraktion mit salzsaurem Methanol konnten zusätzlich  $28 \pm 5\%$  der applizierten Ausgangsaktivität aus den Güllerückständen der 100-Tage-Probe nach Ethylacetat-Extraktion freigesetzt werden.

**Tab. 37: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ) in Schweinegülle (SG-1), Laufmittel Ethylacetat**

	$R_f$ -Wert	Tage nach Applikation						
		0	3	7	30	72	100	177
<b>A-SMZ [%]</b>	0.50	$83 \pm 4$	$56 \pm 0$	$31 \pm 4$	$2 \pm 0$	n.d.	n.d.	n.d.
<b>SMZ [%]</b>	0.82	n.d.	n.d.	3*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	n.d.	$6 \pm 1$	$18 \pm 3$	$25 \pm 1$	$30 \pm 2$	$21 \pm 6$	$18 \pm 6$

\* nur in einem Ansatz detektiert; n.d.: nicht detektiert; MET: Metaboliten; SMZ: Sulfamethoxazol; eingesetzt:  $1380 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle

**Tab. 38: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ) in Schweinegülle, Laufmittel: Chloroform/n-Butanol (8:1)**

	$R_f$ -Wert	Tage nach Applikation						
		0	3	7	30	72	100	177
<b>A-SMZ [%]</b>	0.42	$83 \pm 4$	$52 \pm 0$	$31 \pm 5$	$2 \pm 0$	n.d.	n.d.	n.d.
<b>SMZ [%]</b>	0.70	n.d.	$3 \pm 0$	$4 \pm 1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	n.d.	$5 \pm 1$	$15 \pm 5$	$25 \pm 2$	$30 \pm 1$	$21 \pm 6$	$18 \pm 6$

eingesetzt:  $1380 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle; n.d.: nicht detektiert; MET: Metaboliten; SMZ: Sulfamethoxazol

Zur Qualitätssicherung wurden die 72-Tage-Probe in Doppelbestimmung durchgeführt (72.I und 72.II). Der Vergleich der in **Tab. 39** dargestellten Zusammensetzung zeigte eine hohe Übereinstimmung der beiden Matrices. Lediglich für den biologischen Sauerstoffbedarf waren Abweichungen von  $5.7$  zu  $8.5 \text{ g kg}^{-1}$  festzustellen. Insgesamt konnte auch in den korrespondierenden Matrixcharakterisierungstests des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-

Sulfamethoxazol in Schweinegülle eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität anhand des biologischen Sauerstoffbedarfs auf  $1.7 \text{ g kg}^{-1}$  in 177 Tagen festgestellt werden.

**Tab. 39: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Acetyl-Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1)**

Parameter	Tage nach Applikation							
	0	3	7	30	72.I	72.II	100	177
TS [%]	4	4	5	4	4	4	4	4
TOC [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	19	21	22	19	17	20	21	15
pH	7.8	7.7	7.3	7.6	7.8	7.6	7.7	8.2
Eh [mV]	-230	-220	-200	-200	-170	-190	-110	-240
O <sub>2</sub> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
NH <sub>4</sub> -N [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	2.2	2.1	2.0	2.0	2.0	2.1	2.0	2.1
N <sub>total</sub> [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	3.0	3.0	2.9	3.2	3.2	3.3	3.1	3.2
NH <sub>4</sub> -N/ N <sub>total</sub>	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7
BSB <sub>5</sub> [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	6.8	7.1	6.1	9.1	5.7	8.5	5.9	1.7
CSB [ $\text{g kg}^{-1}$ ]	41	44	46	41	32	41	37	23

eingesetzt:  $1380 \mu\text{g}$  Acetyl-Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle

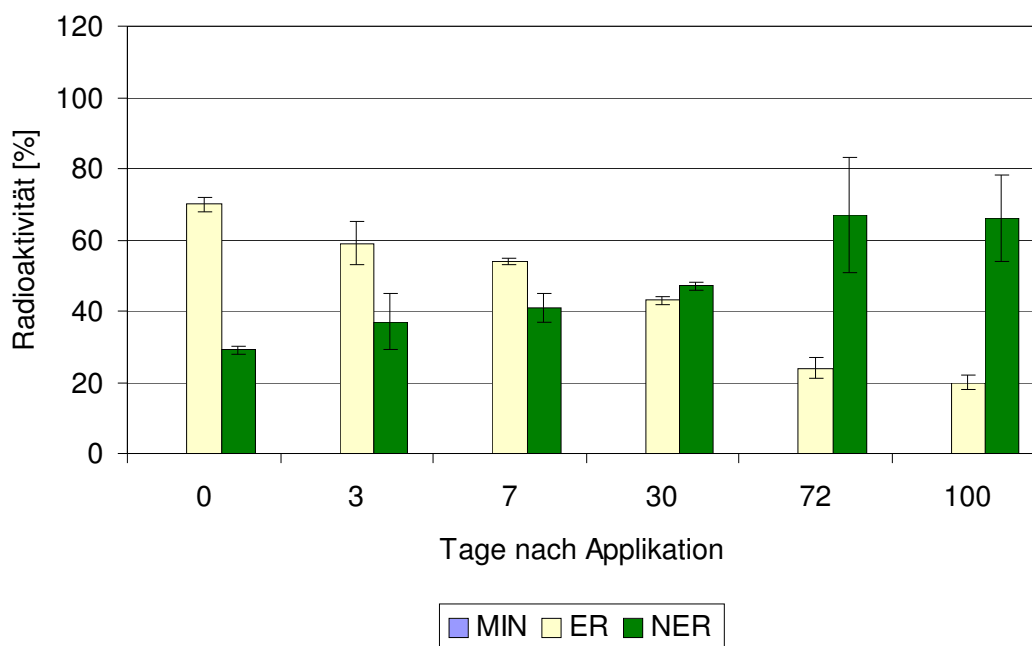
## 4.6 Stabilität von Sulfadiazin in Gülle

Analog zu den Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol erfolgte die Untersuchung des Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rinder- und Schweinegülle. Zusätzlich wurden auch hier Matrixcharakterisierungstests mit unmarkierter Substanz inkubiert und die Güllematrix nach Ende der Inkubation charakterisiert.

### 4.6.1 Rückstandsdynamik von $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rindergülle

Wie aus **Abb. 23** ersichtlich wird, zeigte das Sulfonamid  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin eine andere Rückstandsdynamik in Rindergülle als das Struktur analogon  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol. Insgesamt erfolgte die Abnahme der extrahierbaren Rückstände von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin über die Inkubation von 100 Tagen deutlich langsamer, wobei der Anteil der extrahierbaren Rück-

stände nicht unter 20 % der applizierten Ausgangsaktivität abnahm. In den Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle konnten bereits nach 30 Tagen nicht mehr als 16 bzw. 11 % extrahiert werden (vergleiche Abb. 10, Seite 68), Dennoch erfolgte die Bildung der nicht-extrahierbaren Rückstände mit 29 % an Tag 0 deutlich schneller als beim  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol mit 11 bzw. 10 %. Während der gesamten Inkubationsdauer konnte keine Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden.



**Abb. 23: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ - Sulfadiazin in Rindergülle (RG-1)**

Ein Metaboliten-Screening konnte aufgrund starker Matrixstörungen und einer daraus resultierenden, ungenügenden chromatographischen Trennung für die Extrakte der 0-Tage-Ansätze nicht durchgeführt werden. Auch nach viermaliger Wiederholung des Probenansatzes und des Metaboliten-Screenings ließ sich dieses Problem nicht eliminieren und es musste auf die Auswertung dieser Extrakte verzichtet werden. Im Falle einer Abbaustudie zur Identifizierung der Metaboliten hätte hier die Möglichkeit der Probenaufreinigung durch Anreicherung der Sulfonamide aus dem wässrigen Eluat mittels Festphasenextraktion (Höltge, 2005; Pfeifer et al., 2002) bestanden. Da die Identifizierung der Metaboliten jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war, wurde auf eine weitere Probenaufreinigung an dieser Stelle verzichtet. Für die Extrakte der 3- bis 100-Tage-Ansätze konnte nach Mikrofiltration ein befriedigendes Metaboliten-Screening durchgeführt werden. Nach 3-tägiger Inkubation lagen noch 48 % der unveränderten Ausgangsverbindung vor, 11 % entfielen auf nicht identifizierte Metaboliten (**Tab. 40**). Im weiteren Verlauf konn-

te eine Abnahme der Ausgangsverbindung in den Extrakten auf 14 % nach 100 Tagen bestimmt werden. Auch unter Verwendung des zweiten Laufmittels Chloroform/Butanol (8:1) konnte ein Metaboliten-Screening der 0-Tage-Extrakte nicht durchgeführt werden (siehe Anhang, **Tab. A29**).

**Tab. 40: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin (SDZ) in Rindergülle**

	$R_r$ -Wert	Tage nach Applikation					
		0	3	7	30	72	100
<b>SDZ [%]</b>	0.53	n.b.	$48 \pm 3$	$48 \pm 1$	$26 \pm 1$	$18 \pm 1$	$14 \pm 1$
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	n.b.	$11 \pm 3$	$6 \pm 0$	$18 \pm 1$	$6 \pm 1$	$5 \pm 1$

Laufmittel: Ethylacetat, n.b.: nicht bestimmbar; MET: Metaboliten; eingesetzt:  $220 \mu\text{g}$  Sulfadiazin  $\text{kg}^{-1}$  Gülle

Um den Einfluss der Güllematrix auf das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rindergülle aufzuzeigen, wurde neben der im Stabilitätstest eingesetzten Gülle RG-1 eine weitere Matrix (RG-6) in gleicher Weise dotiert und nach 0-Tagen bzw. 7-tägiger Inkubation extrahiert. Die hier eingesetzte Rindergülle RG-6 wurde, wie die im Stabilitätstest verwendete Gülle, aus Exkrementen einer 5-jähriger Milchkuh, welche im Versuchsstall des Instituts für Tierernährung unter konventionellen Fütterungsbedingungen gehalten wurden, hergestellt (siehe Tab. 4 Seite 17). Die Zusammensetzung der beiden Güllematrizes variierte wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben nur geringfügig. Wie aus **Tab. 41** hervorgeht, konnten 70 bzw. 72 % an Tag 0 und 54 bzw. 52 nach 7 Tagen nahezu identische Anteile der applizierten Ausgangsaktivität aus beiden Güllematrizes extrahiert werden.

**Tab. 41: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in verschiedenen Rindergüllematrizes (RG) nach 0 Tagen und 7-tägiger Inkubation**

	0 Tage		7 Tage	
	RG-1	RG-6	RG-1	RG-6
<b>MIN [%]</b>	n.b.	n.b.	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	$70 \pm 2$	$72 \pm 4$	$54 \pm 1$	$52 \pm 1$
<b>NER [%]</b>	$27 \pm 5$	$22 \pm 1$	$46 \pm 4$	$43 \pm 14$
<b>Bilanz [%]</b>	<b><math>96 \pm 7</math></b>	<b><math>94 \pm 5</math></b>	<b><math>99 \pm 4</math></b>	<b><math>95 \pm 13</math></b>

RG-1: 5-jährige Milchkuh aus Versuchsstall, RG-6: 5-jährige Milchkuh aus Versuchsstall; n.b.: nicht bestimmbar

Im Rahmen der Qualitätssicherung wurde auch für die Matrixcharakterisierungstests mit Sulfadiazin in Rindergülle eine Doppelbestimmung der 100-Tagen-Probe durchgeführt (100.I und 100.II). Der Vergleich der in **Tab. 42** dargestellten Parameter zeigte eine hohe Übereinstimmung der beiden Matrixcharakterisierungstests. Lediglich für den biologischen Sauerstoffbedarf ist eine Abweichung von 2.9 und 6.4 g kg<sup>-1</sup> festzustellen, wobei beide Proben als mikrobiell aktiv einzustufen waren. Der pH-Wert nahm, wie in den Kontrollmatrices der anderen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Stabilitätstests beobachtet, bis Tag 30 von 6.9 auf 6.3 ab und nahm dann bis Tag 100 auf 7.7 zu. Während der gesamten Inkubationsdauer wiesen alle Matrixcharakterisierungstests anaerobe Milieubedingungen mit einem Sauerstoff-Gehalt < 0.1 mg kg<sup>-1</sup> und einem Redoxpotential < +150 mV auf.

**Tab. 42: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfadiazin in Rindergülle (RG-1)**

Parameter	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100.I	100.II
<b>TS [%]</b>	9	10	10	9	10	8	8
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	47	49	43	35	47	40	38
<b>pH</b>	6.9	6.6	6.3	6.8	7.6	7.7	7.9
<b>Eh [mV]</b>	-60	-80	-140	-160	-210	-160	-150
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.4	1.4	1.6	1.3	1.4	1.4	1.3
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.2	3.2	3.1	3.3	3.5	3.3	3.3
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	9.2	9.3	11	8.3	4.5	6.4	2.9
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	98	94	82	67	50	80	75

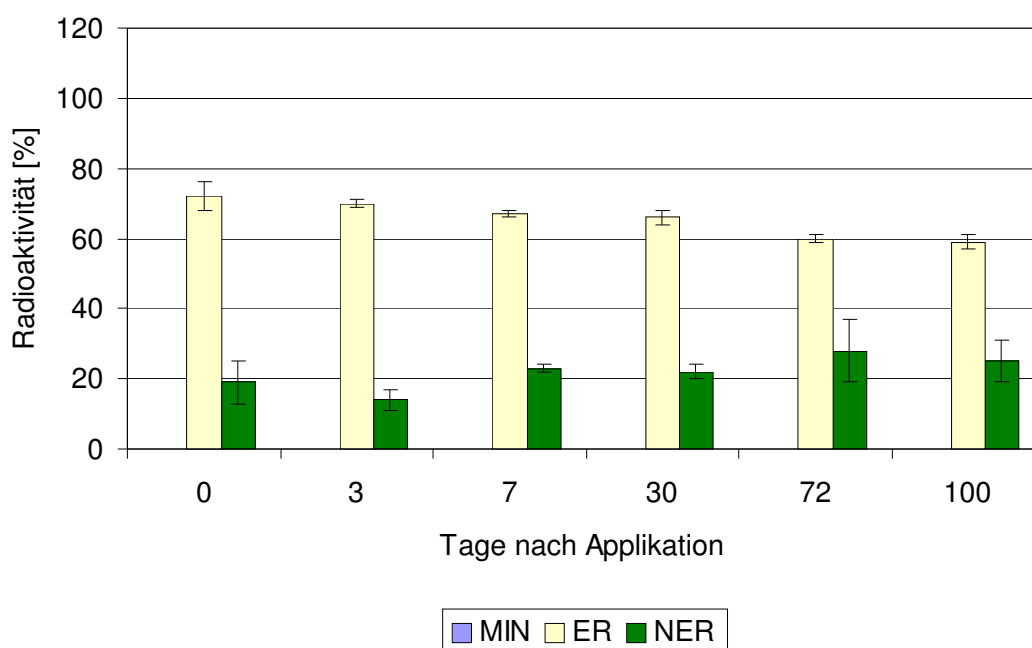
eingesetzt 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle

#### 4.6.2 Rückstandsdynamik von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin in Schweinegülle

<sup>14</sup>C-Sulfadiazin wies im Stabilitätstest in Schweinegülle ein deutlich abweichendes Rückstandsverhalten im Vergleich zu den anderen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Stabilitätstests auf. Über die gesamte Inkubation von 100 Tagen blieb der Anteil der extrahierbaren Rückstände gegenüber den nicht-extrahierbaren Rückständen domi-



nant (**Abb. 24**). Es konnte lediglich eine geringe Abnahme der extrahierbaren Rückstände von 72 auf 59 %, verbunden mit einer Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände von 19 auf 25 %, nachgewiesen werden. Eine Mineralisation oberhalb der Bestimmungsgrenze konnte für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle nicht nachgewiesen werden. Mittels Nachextraktion mit salzsauerem Methanol ließen sich aus den 100-Tage-Rückständen nach Ethylacetat-Extraktion noch einmal  $16 \pm 1$  % der applizierten Ausgangsaktivität extrahieren.



**Abb. 24:** Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle (SG-1)

Auch bei der Auswertung des Metaboliten-Screenings der Ethylacetat-Extrakte zeigten sich deutliche Unterschiede im Verhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rinder- und Schweinegülle. Nach 100-tägiger Inkubation konnten in Schweinegülle noch 46 % der applizierten Ausgangsaktivität als unverändertes  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin identifiziert werden (**Tab. 43**). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in dem mit dem zweiten Laufmittel durchgeführten Metaboliten-Screening (siehe Anhang, **Tab. A31**). Daraus ergab sich nach Timme et al. (1986) ein  $\text{DT}_{50}$  Wert für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle von 445 Tagen. Die von Boxall et al. (2004) angegebene  $\text{DT}_{50}$ -Werte  $< 30$  Tage für alle Sulfonamide kann für Sulfadiazin in Schweinegülle somit nicht bestätigt werden. Auch Grote 2005 konnte für Sulfadiazin in Schweinegülle nach 8-monatiger Lagerung nur eine begrenzte Abnahme der Ausgangssubstanz nachweisen und schließt daraus auf erhebliche Frachten der Substanz bei

Ausbringung der Gülle auf Agrarflächen. Harms (2006) konnte für Sulfadiazin in Schweinegülle eine Abnahme der Konzentration um 50 % in den ersten 7 Tagen der Lagerung bei 7°C feststellen. Im weiteren Verlauf der Untersuchung konnte jedoch auch hier bis zu einer Inkubationsdauer von 32 Wochen keine weitere Konzentrationsabnahme dargestellt werden. Nach der Beurteilung der Persistenz nach Hollis (1991), wäre Sulfadiazin in Schweinegülle mit einem  $DT_{50}$ -Werten > 60 Tagen als hoch persistent einzustufen. Bei der Beurteilung der Persistenz auf Grundlage der Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln in Böden (BBA, 1998) hingegen wäre aufgrund der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände < 70 % Sulfadiazin in Schweinegülle als nicht-persistent zu beurteilen.

**Tab. 43: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin (SDZ) in Schweinegülle**

	<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	<b>Tage nach Applikation</b>					
		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>100</b>
<b>SDZ [%]</b>	0.53	69 ± 3	63 ± 1	60 ± 3	54 ± 1	49 ± 2	46 ± 2
<b>Σ MET [%]</b>	---	3 ± 0	7 ± 1	7 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	13 ± 0

Laufmittel: Ethylacetat, MET: Metaboliten; eingesetzt: 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle

Höltge (2005) konnte ebenfalls Differenzen im Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rinder- und Schweinegülle feststellen, allerdings zeigte sich in Schweinegülle ein anderes Rückstandsverhalten als in dem hier durchgeführten Test. So dominierten bei Höltge (2005) nach 28 Tagen die nicht-extrahierbaren Rückstände mit 69 % zu 21 %. Zudem ließ sich nach dieser Zeit eine Mineralisation von 10 %, nach 101 Tage etwa 18 % nachweisen, wogegen im hier durchgeführten Stabilitätstest keine relevante Freisetzung von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid oberhalb der Bestimmungsgrenze aufgezeigt werden konnte. Bei der von Höltge (2005) verwendeten Schweinegülle handelte es sich um Realproben mit einem durchschnittlichen Trockensubstanzgehalt von 7 % und einem pH-Wert von 7.4. Eine weitergehende Matrixcharakterisierung erfolgte hier nicht, so dass als Ursache für die abweichenden Ergebnisse der Stabilitätstests ein Einfluss der Matrixzusammensetzung nicht ausgeschlossen werden kann. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer umfassend charakterisierten Referenzgülle zur Durchführung reproduzierbarer Abbauuntersuchungen bzw. zur Diskussion abweichender Ergebnisse aufgrund der Matrixzusammensetzung deutlich.

Zusätzlich zu dem Stabilitätstest wurde auch hier eine weitere Schweinegüllematrix (SG-6) in gleicher Weise dotiert, um den Einfluss der Matrix auf das Rückstandsverhalten von

$^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin Schweinegülle aufzuzeigen. Nach 0 bzw. 7 Tagen konnte mit einem Anteil von 81 und 72 % bzw. 67 und 72 % (**Tab. 44**) kein wesentlicher Unterschied in der Extrahierbarkeit von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin aus den beiden Güllematrizes festgestellt werden. Die verwendete Güllematrix (SG-6) wurde wie auch die für den Langzeittest verwendete Gülle (SG-1) aus Exkrementen von Mastschweinen aus dem Versuchsstall des Instituts für Tierernährung (siehe Tab. 5, Seite 18) hergestellt. Beide Tiergruppen erhielten das gleiche Futter, woraus eine ähnliche Güllezusammensetzung resultierte (siehe Tab. 16, Seite 56).

**Tab. 44: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in verschiedenen Schweinegüllematrizes (SG) nach 0 Tagen und 7-tägiger Inkubation**

	0 Tage		7 Tage	
	SG-1	SG-6	SG-1	SG-6
<b>MIN [%]</b>	n.b.	n.b.	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	72 $\pm$ 4	81 $\pm$ 6	67 $\pm$ 1	72 $\pm$ 2
<b>NER [%]</b>	19 $\pm$ 6	17 $\pm$ 5	23 $\pm$ 1	17 $\pm$ 3
<b>Bilanz [%]</b>	<b>91 <math>\pm</math> 2</b>	<b>97 <math>\pm</math> 1</b>	<b>90 <math>\pm</math> 2</b>	<b>89 <math>\pm</math> 5</b>

SG-1: Mastschweine aus Versuchsstall; SG-6: Mastschweine aus Versuchsstall; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. 45: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfadiazin in Schweinegülle**

Parameter	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100.I	100.II
<b>TS [%]</b>	5	5	5	5	4	4	4
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	16	20	16	19	19	17	23
<b>pH</b>	7.8	7.7	7.6	7.4	7.4	7.8	7.8
<b>Eh [mV]</b>	-210	-200	-210	-160	-220	-230	-210
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	2.5	2.2	2.2	2.2	2.1	2.0	1.8
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.2	3.1	3.2	3.3	3.4	3.2	3.2
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	9.9	10	10	9.5	8.9	3.9	5.0
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	41	44	47	44	38	52	34

eingesetzt 220  $\mu\text{g}$  Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle

Die Matrixcharakterisierungstests zeigte, dass die hier eingesetzte Gülle gemessen am biologischen Sauerstoffbedarf über den Zeitraum von 100 Tagen mikrobiell aktiv blieb (**Tab. 45**), wobei auch hier eine Abnahme des biologischen Sauerstoffbedarfs festzustellen war. Im Rahmen der Qualitätssicherung wurde für die 100-Tage-Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt (100.I und 100.II).

Abgesehen vom biologischen Sauerstoffbedarf mit 3.9 und 5.0 g kg<sup>-1</sup> zeigten beide Matrices eine hohe Übereinstimmung in der Zusammensetzung.

#### **4.7 Bewertung des Methodenkatalogs**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden und Ergebnisse lassen eine erste Beurteilung des Testsystems im Hinblick auf die Ausarbeitung eines Methodenkataloges zu Untersuchungen des Rückstandsverhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle zu. Auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen erfolgte die Erarbeitung von Standard-Arbeitsanweisungen zur repräsentativen und reproduzierbaren Herstellung von Referenzgüllematrizes, zur umfassenden Charakterisierung von Exkrement- und Güllematrizes sowie zur Durchführung von Stabilitätstests unter anaeroben Bedingungen in Gülle.

#### **Informationen zu Exkrementen und Gülle**

##### Probennahme

Um die Komplexität und Variabilität von Gülle einschränken zu können, sollten für die Herstellung von Referenzgüllematrizes Exkremente von konventionell gefütterten Einzeltieren oder Gruppen bis zu 8 Tieren über einen Zeitraum von 12 bis 24 h entnommen werden. Die Rasse, das Alter der Tiere, die Fütterungsbedingungen sowie die Haltungsbedingungen sollten bekannt sein. Der Einsatz von Tierarzneimitteln an den beprobten Tieren sowie der Eintrag von Fremdstoffen (z.B. Reinigungs-/Desinfektionsmitteln) in die Exkremente muss auszuschließen sein.

##### Konditionierung und Lagerung

Direkt nach der Ausscheidung unterliegen Exkremente schnell ablaufenden Ab- und Umbauprozessen, wodurch die Heterogenität der Matrix zusätzlich erhöht wird. Zur Ver-

minderung dieses Effekts müssen die Exkrement-Proben vor der Herstellung der Referenzgülle einer Konditionierung unterzogen werden. Hierzu sollten die Exkremente bei Raumtemperatur in größeren Gebinden (z. B. 20 L) gelagert werden, welche einen Gasaustausch erlauben (z.B. Maischefässer mit lose aufgelegten Deckeln). Nach den Ergebnissen der Untersuchung von 2 Rinder- sowie 2 Schweineexkrementen ist eine Konditionierungsphase von mindestens 14 Tagen bei Rinderexkrementen und 21 Tagen bei Schweineexkrementen geeignet. Hier empfiehlt sich aus Gründen der Vereinheitlichung eine Konditionierungsphase von 21 Tagen für beide Exkrementmatrizes. Das Ende der Konditionierungsphase wird durch das Erreichen konstant anaerober Bedingungen (Redoxpotential  $< +150$  mV, Sauerstoffgehalt  $< 0.1$  mg kg<sup>-1</sup>) und dem Erreichen eines stabilen Ammonium-Stickstoff-Gehalts, mit einer maximalen Abweichung von  $\pm 0.2$  g kg<sup>-1</sup> an zwei aufeinander folgenden Messtagen definiert. Nach Abschluss der Konditionierung können die Exkremente direkt für die Herstellung einer Referenzgülle verwendet werden bzw. für eine spätere Referenzgülleherstellung bei  $-20$  °C gelagert werden. Insgesamt blieb die Zusammensetzung der hier untersuchten Rinder- und Schweineexkremente über einen Zeitraum von  $> 300$  Tagen bei einer Lagerungstemperatur von  $-20$  °C im wesentlichen konstant. Nach dem Auftauen sollten die Exkremente für 3 Tage bei  $20$  °C gelagert werden, um die Remobilisierung der inhärenten Mikroorganismen zu gewährleisten.

### Herstellung der Referenzgülle

Zur Herstellung der Referenzgülle muss der Trockensubstanzgehalt der Exkremente bekannt sein um die benötigte Exkrement-Menge zur Herstellung einer Referenzgülle mit definiertem Trockensubstanzgehalt berechnen zu können. Nach der Zugabe von Leitungswasser ist die Gülleprobe zu homogenisieren und sollte einer erneuten Matrixcharakterisierung unterzogen werden.

### **Charakterisierung der Exkremente und Güllematrizes**

Die Charakterisierung der Exkremente und Güllematrizes sollte die folgenden Parameter unter Verwendung der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Methoden beinhalten: Trockensubstanz (TS), mineralischer Gehalt ( $R_{\min}$ ), Phosphor-Gehalt (P), organischer Gesamtkohlenstoff (TOC), pH-Wert, Redox-Potential (Eh), gelöster Sauerstoff ( $O_2$ ), Ammonium-Stickstoff ( $NH_4-N$ ), Gesamt-Stickstoff ( $N_{\text{total}}$ ) und biologischer Sauerstoffbedarf ( $BSB_5$ ). Insgesamt zeigte sich im laborinternen Ringtest unter Anwendung der beschriebenen Methoden eine hohe Reproduzierbarkeit der für die Matrixcharakterisierung angegebenen

Parameter. Durch die umfassende Charakterisierung sind sowohl die für die Gölledün-  
gung wichtigen Nährstoffe wie Stickstoff und Phosphor sowie die wichtigsten physiko-  
chemischen Parameter der Matrix erfasst, welche ebenfalls zur Analyse von Abwässern,  
KlärschlÄmmen oder Böden sowie zur Abschätzung des Biogaspotentials von Gülle he-  
rangezogen werden. Zur Bestimmung der Trockensubstanz bietet die Trocknung mittels  
Infrarot-Strahler alternativ zur Trocknung der Matrices bei 105 °C nach DIN ISO 11465  
(1996) den Vorteil der zeitnahen und schnellen Bestimmung.

Das Redoxpotential sowie der Sauerstoff-Gehalt können Hinweise auf die in den Exkre-  
ment- und Gülleproben vorherrschenden Milieubedingungen geben, wobei ein Sauerstoff-  
gehalt  $< 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  und ein Redoxpotential  $< +150 \text{ mV}$  als Indikator für anaerobe Milieu-  
bedingungen gelten. Der organische Kohlenstoff sowie der Ammonium-Stickstoff-Gehalt  
erlauben Rückschlüsse auf die in den Exkrement- und Gülleproben ablaufenden Umset-  
zungsprozesse. Die mikrobielle Aktivität der Matrix lässt sich indirekt anhand der mikro-  
biellen Abbaubarkeit gemessen am biologischen Sauerstoffbedarf bestimmen. Allerdings  
kann durch diese Methode lediglich die Aktivität der aeroben bzw. fakultativ aeroben  
Mikroorganismen bestimmt werden. Alternativ wäre hier evtl. die Bestimmung der De-  
hydrogenaseaktivität möglich, wobei hier eine Weiterentwicklung des Untersuchungsver-  
fahrens erforderlich wäre, wie erste Untersuchungen zeigten. Eine weitere Möglichkeit zur  
Bestimmung der Anzahl der Mikroorganismen stellt das Koch'sche Plattengussverfahren  
mit anschließender anaerober und aerober Bebrütung dar. Bei diesem Verfahren ist je-  
doch der Kosten-Nutzen-Faktor aufgrund des hohen zeitlichen und materiellen Aufwands  
für die generelle Verwendung dieser Methode abzuwägen.

Während der Entwicklung des Methodenkatalogs standen neben den oben aufgeführten  
Parametern die Bestimmung des Kupfergehaltes sowie des chemischen Sauerstoffs zur  
Diskussion. Der Kupfergehalt wurde aufgrund der bekannten toxischen Wirkung auf Mik-  
roorganismen u.a. im Boden diskutiert. Die Aufnahme dieser Parameter in den Methoden-  
katalog bedingt jedoch ein definiertes Toxizitätslimit. Für Gülle selbst ist eine Toxizität von  
Kupfer bzw. ein Bezug zwischen Kupfergehalt und Stabilität von Tierarzneimitteln nicht  
nachgewiesen. Eine Notwendigkeit der Erfassung dieses Parameters ist damit nicht ge-  
geben.

Für die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs in Exkrementen und Gülle konnte  
mittels Küvettentest in Anlehnung an DIN ISO 15705 (2003) keine gesicherte Aussage  
über den enthaltenen Anteil abbaubarer, organischer Substanz getroffen werden. Die  
Durchführung der Bestimmung des chemischen Sauerstoffgehaltes mittels konventionel-  
lem Aufschlussverfahren nach DIN 38409-41 (1980) war aufgrund des hohen Probenauf-  
kommens und dem damit verbundenen materiellen und zeitlichen Aufwands nicht gerecht-

fertigt. Zudem ist der Nutzen des chemischen Sauerstoffbedarfs zur Charakterisierung von Exkrementen und Gülle fraglich, da der Gehalt an organischer Substanz direkt über die Bestimmung des organischen Kohlenstoffs erfasst wird und der chemische Sauerstoffbedarf somit keine zusätzliche Information liefert. Auch ist die Aussagekraft des chemischen Sauerstoffbedarfs im Bezug auf Tierarzneimittel gering, da keine Kenntnisse über einen Einfluss vorliegen.

### **Abbautests von Tierarzneimitteln in Referenzgülle unter anaeroben Bedingungen**

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendete Testdesign eignet sich prinzipiell für alle radioaktiv markierten oder unmarkierten Tierarzneimittel, für welche geeignete und sensitive analytische Methoden verfügbar sind.

#### Testsubstanzen

Grundsätzlich sollte aufgrund der hohen Komplexität der Güllematrix der Einsatz radioaktiv markierter Substanzen bevorzugt werden. Durch den Einsatz von Radiotracern kann neben den extrahierbaren Rückständen eine vollständige Bilanzierung unter Berücksichtigung der Mineralisation sowie der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände erfolgen. Im Gegensatz hierzu erlaubt der Einsatz unmarkierter Substanzen lediglich die Beurteilung der Rückstandssituation anhand der Konzentrationsabnahme der Ausgangsverbindung. Vor dem Einsatz einer Testsubstanz sollte die radiochemische Reinheit sowie die Position der radioaktiven Markierung bekannt sein, wobei eine möglichst stabile Markierung in der Molekülstruktur zu bevorzugen ist. Des weiteren sollten die Löslichkeit der Substanz in Wasser bzw. organischen Lösungsmitteln bekannt sein. Zur Dotierung und Verteilung der Substanz in Gülle kann die Testsubstanz in Wasser oder wenn nötig, in geringen Mengen organischen Lösungsmittels gelöst werden. Um eine gleichmäßige Verteilung der Substanz in der Gülle zu gewährleisten sollte das Volumen der Standardlösung mindestens 40 µL betragen. Ist die Verwendung von Lösungsmitteln mit bekannter Hemmung der mikrobiellen Aktivität nicht zu vermeiden (z.B. Dichlormethan, Chloroform), können die darin gelösten Testsubstanzen zu z.B. Quarzsand dotiert werden und dieser nach Abdampfen des Lösungsmittels zu den Gülleproben gegeben werden.

#### Analytische Methoden

Für jede zu testende Substanz muss eine geeignete analytische Methode zur Extraktion, Identifikation und Quantifikation der Substanz und evtl. der Metaboliten zur Verfügung

stehen bzw. entwickelt werden. Ein Extraktionsmittel sollte so ausgewählt werden, dass die chemische Natur der nicht-extrahierbaren Rückstände nicht bedeutend verändert wird (EU-Richtlinie 91/141/EWG). Nach Weber (1996) sind gebundene Rückstände durch wässrige oder organische Lösungsmittel nicht extrahierbar. Der Anteil der Rückstände wird somit nicht nur von den Eigenschaften von Wirkstoff und Matrix, sondern auch von der eingesetzten Extraktionsmethode bestimmt (Agnihotri und Barooah, 1994). Damit ist die Bestimmung nicht-extrahierbarer Rückstände immer durch die Methode operationell determiniert. Für die Ausarbeitung eines Methodenkatalogs zur Untersuchung des Rückstandsverhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle bedeutet dies, dass die Vergleichbarkeit der Extraktionseffizienz nur unter Einsatz des gleichen Lösungsmittels gegeben ist. Bisher existiert kein einheitliches Verfahren für die Bestimmung nicht-extrahierbarer Rückstände von Tierarzneimitteln in Gülle. Die Ursachen der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände sowie deren mögliche Remobilisierung in Gülle wurde bisher nicht weiter untersucht. Durch die Radiotraceranalytik wird der quantitative Nachweis der nicht-extrahierbaren Rückstände zwar möglich, doch liefert sie keine Information über die Art der Bindung der Substanzen an eine Matrix. Im Hinblick auf ein Zulassungsverfahren muss die Bestimmung der  $DT_{50}$ -Wert sowie der  $DT_{90}$ -Wert der Substanz möglich sein.

### Testbedingungen und Equipment

Die für die Stabilitätstests ausgewählten Trockensubstanzgehalte von 10 % für Rindergülle und 5 % für Schweinegülle beruhen auf den für Deutschland angegebenen Mittelwerten (ATV-DVWK, 2001; Merkel, 2005; Skark und Zullei-Seibert, 2001). Für Untersuchungen zum Einfluss des Trockensubstanzgehalts auf das Rückstandsverhalten von Tierarzneimitteln in Gülle können jedoch auch geringere bzw. höhere Trockensubstanzgehalte (z. B. 2,5, 5 und 10 %) eingestellt werden.

Grundsätzlich sind für diese Untersuchungen anaerobe Milieubedingungen zu gewährleisten, da Gülle typischerweise unter anaeroben Bedingungen gelagert wird. Hierzu eignen sich geschlossene Testapparaturen, welche einen diskontinuierlichen Gasaustausch erlauben. Die Stabilitätstests von Tierarzneimitteln in Gülle unter Verwendung der auf die OECD Richtlinie 304 A zurückgehende Batch-Apparatur sowie der Durchfluss-Apparatur (OECD-Richtlinie 307, 2002) bewiesen, dass beide Systeme zu übereinstimmenden Ergebnissen führen. Allerdings ermöglicht der Einsatz der Batch-Apparatur eine erhebliche Platz- und Kostenersparnis gegenüber der Durchflussapparatur. Beide Apparaturen sollten regelmäßig mit Stickstoff gespült werden, wobei der Gasaustausch in der Batch-Apparatur für jeweils 5 Minuten in regelmäßigen Abständen erfolgen sollte. Alternativ zu den in der Durchfluss-Apparatur nachgeschalteten Gaswaschflaschen zur Analyse von



gebildetem  $^{14}\text{C}$ -Methan und volatilen Verbindungen, kann der Batch-Apparatur eine Kaskade aus Polyethylenvials mit den entsprechenden Waschlösungen nachgeschaltet werden. Unter Verwendung der Durchfluss-Apparatur ist ein diskontinuierlicher Gasaustausch zur Gewährleistung anaerober Bedingungen ausreichend.

Die Inkubationstemperatur sollte in Anlehnung an Standard-Laborbedingungen (BBA, 1986; OECD, 2002) bei  $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  liegen. Da Gülle während der Lagerung normalerweise von den vorherrschenden Außentemperaturen abhängig ist, können auch geringere Temperaturen für die Durchführung der Stabilitätstests gewählt werden (z.B. 5 und  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). In Anlehnung an die von der Düngeverordnung (2006) geforderte Lagerungskapazität für Gülle von 6 Monaten ist eine Inkubationsdauer von ca. 180 Tagen mit mindestens 5 Inkubationsintervallen sinnvoll, wobei die Inkubation im Dunkeln erfolgen sollte.

Im Vergleich der Ergebnisse zur Bestimmung der Extraktionseffizienz mit den Ergebnissen von Höltge (2005) bzw. Höltge und Kreuzig (2007) zeigte sich, dass hier durch die Verwendung von 50 g Gülle deutlich bessere Bilanzen erreicht werden konnten. Im Hinblick auf ein Zulassungsverfahren wäre somit der Einsatz von mindestens 50 g Referenzgülle in den Stabilitätstests als geeignet anzusehen.

Für radioaktiv markierte Substanzen sollte die Bilanz unter Berücksichtigung der Mineralisation, der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückstände für jedes Inkubationsintervall in % bezogen auf die applizierte Ausgangsaktivität angegeben werden. Die Gesamtbilanz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Stabilitätstest lagen dargestellt für Rindergülle bei  $90 \pm 6\text{ }%$  und für Schweinegülle bei  $92 \pm 6\text{ }%$  (**Abb. 25**). Grundsätzlich sollte eine Wiederfindungsrate von 90-110 %, in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 307 (OECD, 2002), erreicht werden.

Um die Veränderungen in der Güllematrix während der Inkubationsperiode aufzuzeigen, sollten parallel zu jedem Stabilitätstest Matrixcharakterisierungstests mit unmarkierter Testsubstanz inkubiert werden. Hierzu sollten die unmarkierten Referenzsubstanzen entsprechend der Radiotracer-Standardlösungen in gleicher Konzentration analog zu dem jeweiligen Stabilitätstest zu der entsprechenden Güllematrix dotiert und diese nach Ende der Inkubation charakterisiert werden.

## 5 Zusammenfassung

In einem Tierbestand eingesetzte Tierarzneimittel werden als unveränderte Ausgangsverbindungen oder als Metaboliten ausgeschieden und gelangen so in die Gülle. Während der Güllelagerung unterliegen die Substanzen Alterungsprozessen, welche durch den mikrobiellen Abbau, die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bzw. die Sorption an die Feststoffmatrix der Gülle bedingt werden. Aus der stoffspezifischen Persistenz und Bioverfügbarkeit ergibt sich schließlich die Umweltrelevanz der mit der Gülleausbringung verbundenen Einträge von Tierarzneimitteln in die Umwelt. In dem mehrstufigen Prüfkonzzept, welches im Rahmen der Tierarzneimittel-Zulassung zur Anwendung kommt, bleibt bisher jedoch der Abbau als konzentrationsbestimmender Prozess während der Güllelagerung sowie der Einfluss der Güllematrix auf das Rückstandsverhalten von Tierarzneimitteln im Boden unberücksichtigt.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Methodenkatalogs mit Richtliniencharakter zur Durchführung von Labortests zum Abbauverhalten von Tierarzneimitteln in Rinder- und Schweinegülle im Rahmen des vom Umweltbundesamt geförderten Projektes „Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden: Die Erarbeitung eines Methodenkataloges für Labortests“ (UBA-FKZ 204 67 455).

Gülle stellt eine heterogene Probenmatrix hoher Komplexität und Variabilität dar, deren Zusammensetzung von der Tierart, dem Tieralter, den Fütterungsbedingungen, aber auch von Einträgen wie Wasser, Futterresten, Stroh sowie Reinigungs- und Desinfektionsmitteln abhängt. Zudem kann Gülle während der Lagerung weiteren Veränderungen durch Abbauprozesse unterliegen. Aufgrund dieser Faktoren ist die Entnahme von Gülleproben mit reproduzierbarer Zusammensetzung aus Güllesilos oder –tanks, wie sie in der landwirtschaftlichen Praxis genutzt werden, nicht möglich.

Um eine repräsentative und reproduzierbare Gewinnung von Gülleproben zu gewährleisten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezielt Exkrementen von Einzeltieren entnommen, welche unter definierten Bedingungen gehalten wurden. Die Exkrementen wurden einer umfassenden Matrixcharakterisierung anhand folgender Parameter unterzogen: Trockensubstanz (TS), mineralischer Gehalt ( $R_{\min}$ ), Kupfer- und Phosphorgehalt (Cu, P), organischer Gesamt-Kohlenstoff (TOC), pH-Wert, Redox-Potential (Eh), gelöster Sauerstoff ( $O_2$ ), Ammonium-Stickstoff ( $NH_4-N$ ), Gesamt-Stickstoff ( $N_{\text{total}}$ ), biologischer Sauerstoffbedarf (BSB<sub>5</sub>) und chemischer Sauerstoffbedarf (CSB).

In frischen Exkrementen unterliegen die leicht abbaubaren Substanzen schnell ablaufenden Abbauprozessen. Eine Lagerung der Exkrementen bei Raumtemperatur für mindestens 14 Tage bei Rinderexkrementen und 22 Tage bei Schweineexkrementen trug

zur Verminderung der Variabilität der Probenmatrix bei. Nach dieser Konditionierungsphase wurde aus den Exkrementen durch Zugabe von Wasser Referenzgülle mit einem definierten Trockensubstanzgehalt von 10 % in Rindergülle und 5 % in Schweinegülle hergestellt. Die Charakterisierung der hergestellten Gülle bewies, dass sich durch diese Methode die Variabilität der Zusammensetzung von Rinder- und Schweinegülle im Vergleich zur Zusammensetzung von Gülle aus Sammelbehältern landwirtschaftlicher Betriebe deutlich einschränken ließ. Durch die wiederholte Matrixcharakterisierung konnte der Nachweis erbracht werden, dass Exkremente bei -20 °C über mindestens 320 Tage keinen relevanten Veränderungen unterliegen.

Die durchgeführten Stabilitätstests beruhen auf dem Einsatz der hergestellten und umfassend charakterisierten Referenzgüllematrizes, zu welchen die ausgewählten Sulfonamid-Antibiotika Sulfamethoxazol, dessen Hauptmetabolit Acetyl-Sulfamethoxazol, sowie das Strukturanalogon Sulfadiazin als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer dotiert wurden. Die Inkubation erfolgte in geschlossenen Laborbatchsystemen unter für Gülle typischen anaeroben Milieubedingungen bei 20 °C im Dunkeln für 0, 3, 7, 30, 72, 100 und 177 Tage. Hiermit wurde die von der Düngeverordnung vorgeschriebene Lagerkapazität für Gülle von mindestens 6 Monaten berücksichtigt. Nach Abschluss der Inkubationsintervalle wurden die Referenzgüllematrizes einer Extraktion mit Ethylacetat unterzogen und das Abbauverhalten der radioaktiv markierten Testsubstanzen anhand der Mineralisation sowie der Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände beurteilt.

Das Abbauverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Gülle war durch die schnelle Abnahme der extrahierbaren Rückstände und die schnelle Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände gekennzeichnet. Sowohl in Rinder- als auch in Schweinegülle konnte die hydrolytische Umwandlung von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in die Ausgangssubstanz nachgewiesen werden. Insgesamt führte der Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol unter anaeroben Bedingungen in der verwendeten Batch-Apparatur bei Einsatz der gleichen Güllematrix trotz unterschiedlicher Aufwandsmenge zu reproduzierbaren Ergebnissen. Zudem konnte für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol gezeigt werden, dass eine entsprechende Rückstandsdynamik auch dann ermittelt werden kann, wenn die Exkremente vor Beginn der Untersuchungen bei -20 °C gelagert werden.

Für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin erfolgt die Abnahme der extrahierbaren Rückstände in Rindergülle etwas langsamer. Ein deutlich abweichendes Rückstandsverhalten zeigte sich im Stabilitätstest von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle. Hier konnte über 100 Tage lediglich eine geringe Konzentrationsabnahme der extrahierbaren Rückstände von 13 % bestimmt werden. Eine durch die Mineralisation bedingte relevante Freisetzung von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid oder anderen volatilen Verbindungen konnte für die untersuchten

Sulfonamide in Rinder- und Schweinegülle nicht aufgezeigt werden. In Kurzzeittests bis zu 30 Tagen konnte festgestellt werden, dass in den ersten 7 Tagen der Inkubation die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in der Gülle mit zunehmendem Trockensubstanz-Gehalt der Matrix bzw. einer höheren Inkubationstemperatur schneller erfolgte. Dieser Effekt nivellierte sich nach einer Lagerzeit von 30 Tagen.

Die gleichzeitige Durchführung von Matrixcharakterisierungstests erlaubte Rückschlüsse auf die während der Lagerung ablaufenden Prozesse. Anhand des biologischen Sauerstoffbedarfs konnte eine abnehmende, mikrobielle Aktivität der Gülle in allen Stabilitätstests mit zunehmender Inkubationszeit festgestellt werden, wobei die Matrices in allen Tests über die gesamte Inkubationszeit mikrobiell aktiv blieben.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass bei Anwendung des beschriebenen Methodenkataloges eine repräsentative und reproduzierbare Referenzgülle für den Einsatz im Labortest hergestellt werden kann. Anhand der so hergestellten Gülle ist die reproduzierbare Durchführung eines Stabilitätstests von Tierarzneimitteln in Gülle unter Verwendung der auf die OECD Richtlinie 304 A zurückgehenden Batch-Apparatur unter anaeroben Bedingungen möglich. Die durchgeführten Labortests erlauben aufgrund des Testdesigns einen Rückschluss auf die während der Güllelagerung in Güllesilos oder –tanks ablaufenden Prozesse.

Der hier vorgestellte Methodenkatalog stellt damit die Grundlage für eine Diskussion im Hinblick auf die Erstellung einer Richtlinie zum Test von Tierarzneimitteln in Gülle dar.

## 6 Literatur

- Agnihotri, N.P., Barooah, A.K. (1994): Bound residues of pesticides in soil and plant - a review. *J. Sci. Ind. Res.* 53, 850-861.
- Al-Ahmad, A., Daschner, F., Kümmerer, K. (1999): Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 158-163.
- ATV-DVWK (2001): Beeinflussung der Grundwasserqualität durch Wirtschaftsdünger und Sekundärrohstoffe unter besonderer Berücksichtigung problematischer Stoffgruppen - Teilprojekt: Bestandsaufnahme des derzeitigen Kenntnisstandes und Bewertung unter besonderer Berücksichtigung des Grundwasserschutzes. ATV-DVWK-Arbeitsbericht. ISBN 3-935669-71-2.
- Baader, W.; Bardtke, D.; Grabbe, K.; Tietjen, C. (1977): Behandlung tierischer Exkrememente. In: Strauch, D; Baader, W. Tietjen, C. (Hrsg): Abfälle in der Tierhaltung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, ISBN 3-8001-4328-3.
- Baguer, A.J., Jensen, J., Krogh, P.H. (2000): Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere* 40, 751-757.
- BBA (1986): Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus. Richtlinie für die amtlichen Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV. 4-1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, AOC Druck, Braunschweig.
- BBA (1998): Data requirement and criteria for decision-making in the European Union and the Federal Republic of Germany for the authorization procedure of plant protection products. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* 358, 63-68.
- Berger, K., Petersen, B., Büning-Pfaue, H. (1986): Persistenz von Gülle-Arzneistoffen in der Nahrungskette. *Arch. Lebensmittelhyg.* 37, 99-102.
- BfT-Bundesverband für Tiergesundheit (2006): Tierarzneimittelmarkt 2005 in Deutschland. Tiergesundheit im Blickpunkt-Berichte aus der Tiergesundheitsindustrie in Europa, 51.
- BLAC, (2003): Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Freie und Hansestadt Hamburg.
- Bouwman, G., Reus, J. (1994): Persistence of medicines in manure. Report CLM-163-1994.
- Boxall, A.B.A., Blackwell, P.A., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J. (2002): The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol. Lett.* 131, 19-28.

- Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Kay, P., Blackwell, P.A., Pemberton, E.J., Croxford, A. (2004): Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180, 1-91.
- Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S. (2006): Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2288-2297.
- Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sørensen, B., Tolls, J. (2003): Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* 37, 265-304.
- Braun, G., Stock, H., Furtmann, K. (1999): Verbesserung der Einleiterüberwachung durch die Einführung der Meßgrößen TOC, TNb und Pges-ICP. UBA-Texte Bd. 69/99,, Forschungsbericht 296 22 322.
- Buning, S. (1997): Ein Beitrag zur Optimierung der Längsverteilung von Flüssigmist. Diss., TU- Braunschweig.
- Burton, C., Turner, C., Beck, J.A.F., Martinez, J., Martens, W., Pahl, O., Piccinini, S., Svoboda, I. (2003): Manure management - Treatment strategies for sustainable agriculture. Silsoe Reserch Institute, Wrest Park, Bedford, UK.
- Campagnolo, E., Johnson, K., Karpaty, A., Rubin, C., Kolpin, D., Meyer, M., Esteban, E., Currier, R. (2002): Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Sci. Total Environ.* 299, 89-95.
- Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S.M., Gupta, S.C. (2005): Technical report - Ecological risk assessment - Anitbacterial activity of soil bound antibiotics. *J. Environ. Qual.* 34, 1952-1957.
- Christian,T., Schneider, R., Färber, H., Skutlarek, D., Meyer, M., Goldbach, H. (2003): Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. *Acta Hydrochem. Hydrobiol.* 31, 36-44.
- DeLiguoro, M., Cibi, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Motesissa, C. (2003): Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52, 203-212.
- Deutscher Wetterdienst (2005): Jahresübersicht 2005, Die Großwetterlage Europas, Die Großzirkulation im Jahr 2005. 58. Jahrgang, Nr. 13. Deutscher Wetterdienst.
- DIN 38404-6 (1984): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C); Bestimmung der Redox-Spannung (C 6). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN 38409-41 (1980): Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H); Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) im Bereich über 15 mg/l (H 41). Beuth Verlag, Berlin.

- DIN EN 12176 (1998): Charakterisierung von Schlamm, Bestimmung des pH-Wertes. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12879-S3a (2001): Charakterisierung von Schlämmen – Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 1899-1 (1998): Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n-Tagen (BSB<sub>n</sub>). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 25814 (1992): Wasserbeschaffenheit; Bestimmung des gelösten Sauerstoffs; Elektrochemisches Verfahren (ISO 5814:1990). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN ISO 11885 (1998): Bestimmung von 33 Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 10694 (1996): Bestimmung von organischem Kohlenstoff und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 11261 (1997): Bestimmung von Gesamt-Stickstoff, Modifiziertes Kjeldahl-Verfahren. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 11268-1 (1997): Bodenbeschaffenheit - Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) - Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 15705 (2003): Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (ST-CSB) - Küvettentest (ISO 15705:2002). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 11465 (1996): Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse - Gravimetrisches Verfahren. Beuth Verlag, Berlin.
- Domsch, K. (1992): Pestizide im Boden, mikrobieller Abbau und Nebenwirkungen auf Mikroorganismen. VCH Wiley Weinheim, ISBN: 3-527-28431-1.
- Düngeverordnung (2006): Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen. BGBl. I S. 20 2006.
- EMA (1998): Note for guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products. EMA/CVMP/055/96-Final. EMA, London, UK.
- FEDESA (2001): Antibiotics use in farm animals does not threaten human health, a new study suggests. Fédération Européenne de la Santé Animale – European Federation of Animal Health, 13 June 2001, Visby, Sweden.
- Fernández, C., Alosa, C., Babín, M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J. (2004): Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. *Sci. Total Environ.* 323, 63-69.

- Garcia, E.M., Camaches, M.D., Martínez, F.P., Gambín, R.M. (1998): A compared study of thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of sulphamethazine. *Alimentaria*, 77-81.
- Grafe, A.(2000): Untersuchungen zum Einsatz von pharmakologisch wirksamen Stoffen in der Veredelungswirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Tetracycline. Diss. Uni Göttingen.
- Grote, M. (2005): Antiinfektivaeinträge aus der Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente. Abschlußbericht, Forschungsauftrag: IIA5-2038.06.06.01-B/T 2/01.
- Hahne, J. (2001): Untersuchungen zu den stofflichen Umsetzungen bei der aerob-thermophilen Belüftung und Einsatz des Verfahrens zur Nährstoffabtrennung aus Schweinegülle. Diss. TU Braunschweig.
- Haller, M., Müller, S., McArdell, C., Alder, A., Suter, M. (2002): Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 952, 111-120.
- Halling-Sørensen, B., Jensen, J., Tjørnelund, J., Monforts, M.H.M.M. (2001): Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture. In: Kümmerer, K. (Ed.): *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer Berlin, Heidelberg, New York. 143-157.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P., Ingerslev, F., Holten Luthøft, H., Jørgensen, S. (1998): Occurrence, fate and effect of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Ingerslev, F., Jensen, L.B. (2003): Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazine, streptomycin, ciprofloxacin and olaquinox due to environmental processes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 7-16.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J. (2002): Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 263-271.
- Hamscher, G., Pawelzick, H., Höper, H., Nau, H. (2005): Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 861-868.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. (2001): Tierarzneimittel als persistente organische Kontaminanten von Böden. In: 10 Jahre Boden-Dauerbeobachtung in Niedersachsen 17.-18.10.2001, Hannover, Tagungsband, 13.1-13.4.



- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with animal slurry by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 1509-1518.
- Harms, S. (2006): Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Antibiotika und deren Metaboliten in Schweinegülle. Diss. TU München.
- Heise, J., Höltge, S., Schrader, S., Kreuzig, R. (2006): Chemical and biological characterization of non-extractable sulfonamide residues in soil. *Chemosphere*, 65, 2352-2357.
- Hoffmann, H., Hege, U. (1991): Gülle – ein wertvoller Wirtschaftsdünger, ADI 1149, J.P: Bachem GmbH & Co. KG. Köln.
- Hollis, J.M. (1991): Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. In: Walken, A., (ed.) *Pesticides in soil and water: current perspectives*. Lavenham Press Ltd., Lavenham, UK. BCPC Monograph 47, 165-174.
- Höltge, S. (2005): Zum Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden – Labortests und Testplot-Experimente –. Diss. TU Braunschweig. ISBN 3-933893-40-2.
- Höltge, S., Kreuzig, R. (2007): Laboratory testing of sulfamethoxazole and its metabolite acetyl-sulfamethoxazol in soil. *Clean* 35, 104-110.
- Hölzel, S. (2006): Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene in Schweinegülle. Diss. TU München.
- Höper, H., Hamscher, G., Pawelzick, H., Schäfer, W., Nau, H. (2003): Occurrence and fate of tetracyclines and sulfonamides in soils fertilized with animal manure. *Mitt. Inst. Grundwasserwirtschaft TU Dresden* 3, 117-124.
- Höper, H., Kues, J., Nau, H., Hamscher, G. (2002): Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden. *Bodenschutz, BVB* 7, 141-149.
- Hüther, L. (1999): Entwicklung Boden analytischer Methoden und Untersuchungen von Einflussfaktoren auf Ammoniak-, Methan- und Distickstoffmonoxidemissionen aus Flüssig- und Festmist. Diss. TU Braunschweig.
- Hütter, L. (1994): *Wasser und Wasseruntersuchung*. 6. Auflage, Salle und Sauerländer, Frankfurt/Main. ISBN: 3793550753.
- IFAH (2005): Facts and Figures about the European Animal Health Industry <http://www.ifahsec.org/Europe/publications/Facts%20and%20figures%20about%20the%20European%20Animal%20Health%20industry.pdf>

- ISO 5664 (1984): Bestimmung von Ammonium: Destillations- und Titrationsverfahren. Beuth Verlag, Berlin.
- Kay, P., Blackwell, P., Boxall, A. (2004): Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1136-1144.
- Klein-Goedicke, J. (2005): Arzneimittelinsatz in der intensiven Tierhaltung. In: Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen sie das Umweltbundesamt. UBA-Texte 29/05, ISSN 0722-186X, 65-69.
- Knacker, T., Duis, K., Ternes, T., Fenner, K., Escher, B., Schmitt, H., Römbke, J., Garric, J. (2005): The EU-project ERAPharm. Incentives for the further development of guidance documents?. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 12, 62-65.
- Koschorreck, J., Koch, C., Rönnefahrt, I. (2002): Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU - a regulatory perspective. *Toxicol. Lett.* 131, 117-124.
- Kreuzig, R., Heise, J., Höltge, S. (2006): Das Gülle-Projekt – Ausarbeitung eines Methodenkataloges zur Untersuchung des Rückstandsverhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden. *Mitt. Umweltchem. Ökotox.* 12, 39-42.
- Kreuzig, R., Höltge, S. (2005): Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 771-776.
- Kreuzig, R., Höltge, S., Heise, J., Kolb, M., Berenzen, N., Hahn, T., Jergentz, S., Wogram, J., Schulz, R. (2007): Untersuchungen zum Abflussverhalten von Arzneimitteln bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide. UBA-Texte, Forschungsbericht 201 67 401/02, ISSN 0722-186X.
- Kreuzig, R., Kullmer, Ch., Matthies, B., Plaga, B., Dieckmann, H., Höltge, S. (2005): Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsyste-men "Modellsystem Boden". UBA-Texte, Forschungsbericht 201 67 401/02, 0722-186X.
- Kühne, M., Ihnen, D., Agther, O. (2000): Stability of tetracycline in water and liquid manure. *J. Vet. Med.* 47, 379-384.
- Kullmer, Ch. (2005): Humanpharmaka-Rückstände in Böden: Labortests zu Abbau und Verlagerung. Diss. TU-Braunschweig. ISBN 3-86537-615.
- Kumar, K., Gupta, S., Chander, Y., Singh, A. (2005a): Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. In: Sparks, D. (ed): *Advances in Agronomy*, Volume 87. Elsevier Inc., ISBN: 0-12-000785-1, 1-54.
- Kumar, K., Gupta, S., Baidoo, S., Chander, Y., Rosen, C., (2005b): Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 34, 2082-2085.

- Kümmerer, K., Al-Ahmed, A., Mersch-Sundermann, V. (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40, 701-710.
- Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL) (2005): Schwermetalle und Tierarzneimittel in Wirtschaftsdüngern. KTBL-Schrift 435, Darmstadt. ISBN 3-7843-2182-8.
- Lallai, A., Mura, G., Onnis, N. (2002): The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresource Technol.* 82, 205-208.
- Langhammer, J. (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Diss. Universität Bonn.
- Langhammer, J., Büning-Pfaue, H., Winkelmann, J., Körner, E. (1988): Chemotherapeutika-Rückstände und Resistenzverhalten bei der Bestandsbehandlung von Sauen post partum. *Tierärztl. Umschau* 43, 375-382.
- Loke, M.L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J. (2003): Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatographie-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems. *J. Chromatog. B* 783, 11-23.
- Löscher, W., Ungemach, F., Kroker, R. (2003): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 6. Auflage, Parey Verlag. ISBN: 3830441606.
- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J. (2002): Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34, 93-106.
- Merkel, D. (2005): Persönliche Mitteilung, Lufa Nord-West.
- Michels, J., Track, T., Gehrke, U., Sell D. (2000): Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Grün-Weiße-Reihe des Umweltbundesamts, Veröffentlichungen des BMBF.
- Møller, H., Sommer, S., Ahring, B. (2004): Biological degradation and greenhouse gas emission during pre-storage of liquid animal manure. *J. Environ. Qual.* 33, 27-36.
- Montforts, M. (1999): Environmental risk assessment for veterinary medicinal products. Part 1. Other than GMO-containing and immunological products. First update. RIVM Report 60130001.
- Montforts, M. (2003): Environmental risk assessment for veterinary medicinal products. Part 1. Non-immunological drug substances. Second update. RIVM Report 620202001.
- Montforts, M. (eds), Blackwell, P., Boxall, A., Halling-Sørensen, B., Hermansen, S., Ingerslev, S., Jacobsen, A., Kay, P. (2003): Environmental Risk Assessment for

- Veterinary Medicinal Products. Part 5. A guide to risk assessment of veterinary medicinal products used in animal husbandry. RIVM report 601450018. URL: <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk/ecochemistry/eravmis/eravguid1.pdf>.
- Montforts, M., Kalf, D., Vlaardingen, P., Linders, J. (1999): The exposure assessment for veterinary medicinal products. *Sci. Total Environ.* 225, 119-133.
- Montforts, M., Tarazona Lafarga, J. (2003): Environmental risk assessment for veterinary medicinal products, Part 4. Exposure assessment scenarios. RIVM report 601450017. URL: <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk/ecochemistry/eravmis/eravguid2.pdf>.
- Moral, R., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Paredes, C. (2005): Estimation of nutrient values of pig slurries in Southeast Spain using easily determined properties. *Waste Manage.* 25, 719-725.
- Ndegwa, P.; Zhu, J.; Luo, A. (2003): Effects of bioreactor temperature and time on odor-related parameters in aerated swine manure slurries. *Environ. Toxic.* 24, 1007 - 1016.
- Nielsen, H., Mladenovska, Z., Westermann, P., Ahring, B. (2004): Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. *Biotchnol. Bioeng.* 86, 291-300.
- OECD (1981): Guideline for testing of chemicals. Inherent biodegradability in soil. 307. Paris.
- OECD (2000): Guideline for testing of chemicals. Adsorption-desorption using a batch-equilibrium method. 106. Paris.
- OECD (2002): Guideline for testing of chemicals. Aerobic and anaerobic transformation in soil. 307. Paris.
- Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K., Spiteller, M. (2002): Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spec.* 16, 663-669.
- Pfeiffer, C., Emmerling, C., Schröder, D., Niemeyer, J. (1998): Antibiotika (Ivermectin, Monensin) und endokrine Umweltchemikalien (Nonylphenol, Ethinylöstradiol) im Boden. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 10, 147-153.
- Rönnefahrt, I., Koschorreck, J., Kolossa-Gehring, M. (2002): Arzneimittel in der Umwelt - Teil 2: Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte. *Mitteil. FG Umweltchemie. Ökotox.*, 8, 6-9.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A. (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.

- Sattelberger, R., Gans, O., Marinez, E. (2005): Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden. Berichte BE-272, Umweltbundesamt GmbH, Wien, Umweltbundesamt Österreich. ISBN 3-85457-775-3.
- Schäffer, A., Berns, A., Breitschwerdt, A., Ertunc, T. (2002): Struktur und Verfügbarkeit gebundener Pestizidrückstände in Böden und Pflanzen. GDCH e.V., Jahrestagung 2002-Umweltchemie und Ökotoxikologie, Kurzreferate und Teilnehmerverzeichnis, 73.
- Schluesener, M., von Arb, M., Bester, K. (2006): Elimination of macrolides, tiamulin and salinomycin during manure storage. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 21-28.
- Schneidereit, M. (2005): Verbrauchsmengen von Tierarzneimitteln. In: Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen sie das Umweltbundesamt. UBA-Texte 29/05, ISSN 0722-186X.
- Schuchhardt, F., Hahne, J. (1996): Aerobe Behandlung landwirtschaftlicher Reststoffe, Nr. 5657. In: Hösel, G., Kumpf, W.: Müll-Handbuch. Sammlung und Transport, Behandlung und Ablagerung sowie Vermeidung und Verwertung von Abfällen; ergänzbares Handbuch für die kommunale und industrielle Abfallwirtschaft. Schmidt Verlag, Berlin, ISBN: 0176-4969.
- Skark, C., Zullei-Seibert, N. (2001): Beeinflussung der Grundwasserqualität durch Wirtschaftsdünger und Sekundärrohstoffe. ATV-DVWK Arbeitsbericht, ATV-DVWK Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V. (Hrsg.). GFA Gesellschaft zur Förderung der Abwassertechnik, ISBN 3-935669-71-2.
- Spaepen, K., Van Leemput, L., Wislocki, P., Verschueren, C. (1997): A uniform procedure to estimate the predicted environmental concentration of the residues of veterinary medicines in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1977-1982.
- Statistisches Bundesamt (2006): Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Viehbestand und tierische Erzeugnisse 2005. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Stolz, W. (2005): Radioaktivität: Grundlagen, Messung, Anwendung. Teubner B.G. GmbH, ISBN 3519530228.
- Sukul, P., Spiteller, M. (2006): Sulfonamides in the environment as veterinary drugs: present status and future scopes - A review. Rev. Environ. Contam. T. 187, 67-101.
- Thiele, S., Beck, I. (2001): Wirkungen pharmazeutischer Antibiotika auf die Bodenmikroflora - Bestimmung mittels ausgewählter bodenbiologischer Testverfahren. Mitt. Deutsch. Bodenk. Gesellschaft. 96, 383-384.
- Thiele-Bruhn, S. (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. J. Plant Nutr. Soil Sc. 166, 145-167.

- Thiele-Bruhn, S., Beck, I. (2005): Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457-465.
- Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H., Leinweber, P. (2004): Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soil and particle-size fractions. *J. Environ. Qual.* 33, 1331-1342.
- Tietjen, C., Grabbe, K., Strauch, D., Hillinger, H.G. (1977): Zusammensetzung, Eigenschaften und Verhalten tierischer Exkreme. In: Strauch, D.; Baader, W. Tietjen, C. (Hrsg): *Abfälle in der Tierhaltung*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, ISBN 3-8001-4328-3.
- Timme, G., Fehse, H., Laska, V. (1986): Zur statistischen Interpretation und graphischen Darstellung des Abbauverhaltens von Pflanzenschutzmittel-Rückständen. II. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* 39, 188-204.
- Tolls, J. (2001): Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 3397-3406.
- van Vlaardingen, P., de Kneet, A., Janssen, P., (2001): Degradation of veterinary drugs in manure. In: Luttik, R., von Raaij, M. (ed): *Factsheets for the (eco)toxicological risk assessment strategy of the National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)*. RIVM report 601516007.
- VICH (2000): Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) - Phase I. VICH GL6, Ecotoxicity Phase I, Bruxelles, Belgium.
- VICH (2003): Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) - Phase II Draft Suidiance. VICH GL38, Ecotoxicity Phase II, Bruxelles, Belgium.
- Wang, Q., Guo, M., Yates, S. (2006): Degradation kinetics of manure-derived sulfadimethoxine in amended soil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 157-163.
- Weber, N.E. (1996): Bound Residues - developments on their release from matrices and methods of analysis. In *Residues of Veterinary Drugs in Food*, ed. Haagsma, N. and Ruiter, A., *Proceedings of the EuroResidue III Conference*, University of Utrecht, CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek, Den Haag, 127-138.
- Winckler, C., Engels, H., Hund-Rinke, K., Luckow, T., Simon, M., Steffens, G. (2004): Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden. UBA-Texte, Research Report 200 73 248, ISSN 0722-186X.
- Winckler, C., Grafe, A. (2001): Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden (Zusammenfassung). - Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA) Olden-

durg der Landwirtschaftskammer. Weser-Ems (LWK-WE). Forschungsbericht 297 33 911, UBA-FB 000074.

Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, O., (2000): Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to daphnia magna. Chemosphere 40, 723-730.

Zhang, Z.J., Westerman, P.W. (1997): Solid-liquid separation of annual manure for odor control and nutrient management. Appl. Eng. Agric. 13, 385-393.

## Anhang

Tab. A1: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Ibuprofen in Schweinegülle (SG-1)

	Tage nach Applikation			
	0	3	7	30
<b>MIN [%]</b>	n.b.	$0.1 \pm 0.0$	$0.1 \pm 0.0$	$0.4 \pm 0.0$
<b>ER [%]</b>	$64 \pm 7$	$61 \pm 2$	$66 \pm 0$	$65 \pm 4$
<b>NER [%]</b>	$27 \pm 6$	$29 \pm 8$	$24 \pm 1$	$31 \pm 6$
<b>Bilanz [%]</b>	<b>91</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>96</b>

eingesetzt:  $33 \mu\text{g Ibuprofen kg}^{-1}$  Gülle; nicht bestimmbar

Tab. A2: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol nach 7-tägiger Inkubation in verschiedenen Labortest-Systemen

	Rindergülle (RG-1)		Schweinegülle (SG-1)	
	B-A	D-A	B-A	D-A
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	27	$23 \pm 2$	45	$47 \pm 1$
<b>NER [%]</b>	70	$73 \pm 4$	58	$54 \pm 11$
<b>Bilanz [%]</b>	<b>97</b>	<b>96</b>	<b>103</b>	<b>101</b>

eingesetzt:  $560 \mu\text{g Sulfamethoxazol kg}^{-1}$  Gülle; B-A: Batch-Apparatur; D-A: Durchfluss-Apparatur

Tab. A3: Relative Radioaktivitätsverteilung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol (SMZ) in den Extrakten nach 7-tägiger Inkubation in verschiedenen Labortest-Systemen

	Laufmittel: Ethylacetat					Laufmittel: Chloroform/n-Butanol				
	$R_f$	RG-1		SG-1		$R_f$	RG-1		SG-1	
	Wert	B-A	D-A	B-A	D-A	Wert	B-A	D-A	B-A	D-A
<b>SMZ [%]</b>	0.84	n.d.	n.d.	11	14	0.72	n.d.	n.d.	13	12
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	27	23	34	32	---	27	23	29	34

B-A: Batch-Apparatur; D-A: Durchfluss-Apparatur; MET: Metaboliten; nicht detektiert



**Tab. A4: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin nach 7-tägiger Inkubation in verschiedenen Labortest-Systemen**

	Rindergülle (RG-1)		Schweinegülle (SG-1)	
	B-A	D-A	B-A	D-A
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	52 ± 1	54 ± 3	72 ± 2	74 ± 1
<b>NER [%]</b>	43 ± 14	56 ± 4	17 ± 3	33 ± 5
<b>Bilanz [%]</b>	<b>95</b>	<b>110</b>	<b>89</b>	<b>107</b>

eingesetzt: 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle; B-A: Batch-Apparatur; D-A: Durchfluss-Apparatur

**Tab. A5: Relative Radioaktivitätsverteilung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin (SDZ) in den Extrakten nach 7-tägiger Inkubation in verschiedenen Labortest-Systemen**

	Laufmittel: Ethylacetat					Laufmittel: Chloroform/n-Butanol				
	R <sub>f</sub>	RG-1		SG-1		R <sub>f</sub>	RG-1		SG-1	
	Wert	B-A	D-A	B-A	D-A	Wert	B-A	D-A	B-A	D-A
<b>SDZ [%]</b>	0.60	37 ± 1	34 ± 1	64 ± 3	70 ± 1	0.45	45 ± 0	47 ± 1	66 ± 0	71 ± 1
<b>Σ MET [%]</b>	0.05	16 ± 2	20 ± 1	8 ± 1	4 ± 0	---	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 2	4 ± 1

B-A: Batch-Apparatur; D-A: Durchfluss-Apparatur; MET: Metaboliten

**Tab. A6: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1; 1. Ansatz; n = 2)**

	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	96 ± 7	42 ± 2	24 ± 1	16 ± 0	7 ± 1	3 ± 1	3 ± 2
<b>NER [%]</b>	12 ± 2	48 ± 4	62 ± 6	64 ± 2	75 ± 15	79 ± 16	95 ± 6
<b>Bilanz [%]</b>	<b>108</b>	<b>90</b>	<b>86</b>	<b>80</b>	<b>82</b>	<b>82</b>	<b>98</b>

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A7: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1; 2. Ansatz; n = 1)**

	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	86	44	31	11	4	4	4
<b>NER [%]</b>	10	47	61	78	89	76	88
<b>Bilanz [%]</b>	<b>96</b>	<b>91</b>	<b>92</b>	<b>89</b>	<b>93</b>	<b>80</b>	<b>92</b>

eingesetzt: 1250  $\mu\text{g}$  Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A8: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol (SMZ) in Rindergülle (RG-1; 2. Ansatz; n = 1)**

	<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	Tage nach Applikation						
		0	3	7	30	72	100	177
<b>SMZ [%]</b>	0.66	72	20	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><math>\Sigma</math> MET [%]</b>	---	15	24	26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Laufmittel: Chloroform/n-Butanol (8:1); eingesetzt: 1250  $\mu\text{g}$  Sulfamethoxazol  $\text{kg}^{-1}$  Gülle; MET: Metaboliten

**Tab. A9: Matrixcharakterisierungstests ohne Zusatz in Rindergülle (RG-1; 1. Ansatz)**

<b>Parameter</b>	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>TS [%]</b>	11	11	11	11	10	9	9
<b>TOC [g <math>\text{kg}^{-1}</math>]</b>	40	40	38	34	42	36	38
<b>pH</b>	6.8	6.7	6.1	6.0	7.7	7.4	7.4
<b>Eh [mV]</b>	90	130	110	20	70	70	-40
<b>O<sub>2</sub> [mg <math>\text{kg}^{-1}</math>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g <math>\text{kg}^{-1}</math>]</b>	1.3	1.3	1.4	1.5	1.7	1.4	1.6
<b>N<sub>total</sub> [g <math>\text{kg}^{-1}</math>]</b>	3.1	3.4	3.4	3.5	3.6	3.4	3.3
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5
<b>BSB<sub>5</sub> [g <math>\text{kg}^{-1}</math>]</b>	10	5.4	7.9	11	12	7.0	4.7
<b>CSB [g <math>\text{kg}^{-1}</math>]</b>	60	61	89	66	76	61	55

**Tab. A10: Matrixcharakterisierungstests mit Lösungsmittel in Rindergülle (RG-1; 1. Ansatz)**

Parameter	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>TS [%]</b>	11	10	11	10	9	11	10
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	44	41	45	39	38	50	44
<b>pH</b>	7.2	6.9	6.1	6.2	7.5	7.5	7.5
<b>Eh [mV]</b>	90	140	130	10	50	80	-90
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.4	1.3	1.3	1.5	1.6	1.6	1.7
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.4	3.5	3.2	3.3	3.4	3.4	3.1
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	11	5.9	11	15	13	11	6.0
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	62	56	81	82	71	71	49

eingesetzt: 500 µL Acetonitril kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A11: Stabilität von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1; 1. Ansatz; n=2)**

	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	102 ± 5	66 ± 4	47 ± 4	27 ± 1	29 ± 1	22 ± 3	21 ± 2
<b>NER [%]</b>	7 ± 1	33 ± 0	54 ± 0	59 ± 6	77 ± 6	68 ± 4	70 ± 10
<b>Bilanz [%]</b>	<b>109</b>	<b>99</b>	<b>101</b>	<b>86</b>	<b>106</b>	<b>90</b>	<b>91</b>

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A12: Stabilität von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1; 2. Ansatz; n=1)**

	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	76	52	39	25	25	26	22
<b>NER [%]</b>	22	43	49	54	68	70	54
<b>Bilanz [%]</b>	<b>98</b>	<b>95</b>	<b>88</b>	<b>79</b>	<b>93</b>	<b>96</b>	<b>76</b>

eingesetzt: 1250 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A13: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol (SMZ) in Schweinegülle (SG-1; 2. Ansatz; n=1)**

	<b>R<sub>r</sub>-Wert</b>	<b>Tage nach Applikation</b>						
		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>100</b>	<b>177</b>
<b>SMZ [%]</b>	0.68	74	40	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Σ MET [%]</b>	---	2	13	19	25	25	26	22

Laufmittel: Chloroform/n-Butanol (8:1); eingesetzt: 1250 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; n.d.: nicht detektiert; MET: Metaboliten

**Tab. A14: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1) bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen**

	<b>5 °C</b>			<b>10 °C</b>			<b>20 °C</b>		
	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 30</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 30</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 30</b>
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	60 ± 10	45 ± 0	12 ± 1	66 ± 0	36 ± 2	16 ± 0	42 ± 2	24 ± 1	16 ± 0
<b>NER [%]</b>	39 ± 3	55 ± 8	74 ± 6	38 ± 2	58 ± 6	80 ± 0	48 ± 4	62 ± 6	64 ± 2
<b>Bilanz [%]</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>86</b>	<b>104</b>	<b>94</b>	<b>96</b>	<b>90</b>	<b>86</b>	<b>80</b>

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A15: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1) bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen**

	<b>5 °C</b>			<b>10 °C</b>			<b>20 °C</b>		
	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 30</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 30</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 30</b>
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	70 ± 4	63 ± 15	34 ± 1	82 ± 1	67 ± 1	19 ± 1	66 ± 4	47 ± 4	27 ± 1
<b>NER [%]</b>	24 ± 1	35 ± 6	70 ± 11	27 ± 3	39 ± 3	76 ± 8	33 ± 0	54 ± 0	59 ± 6
<b>Bilanz [%]</b>	<b>94</b>	<b>98</b>	<b>104</b>	<b>109</b>	<b>106</b>	<b>95</b>	<b>99</b>	<b>101</b>	<b>86</b>

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A16: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Rindergülle bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen**

Parameter	5 °C			10 °C			20 °C		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>TS [%]</b>	auf 10 % eingestellt			auf 10 % eingestellt			auf 10 % eingestellt		
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	41	41	40	42	37	33	42	36	48
<b>pH</b>	7.4	7.4	7.5	7.1	6.8	7.8	6.4	6.1	6.1
<b>Eh [mV]</b>	10	-30	-210	90	100	-70	140	130	50
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.2	1.1	0.9	1.2	1.2	1.7	1.3	1.4	1.5
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.5	3.4	3.7	3.1	3.2	3.4	3.6	3.4	3.8
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.3	0.3	0.2	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	8.2	5.7	4.3	4.0	12	4.7	7.4	7.1	11
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	65	61	66	54	67	41	68	81	65

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A17: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Schweinegülle bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen**

Parameter	5 °C			10 °C			20 °C		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>TS [%]</b>	auf 5 % eingestellt			auf 5 % eingestellt			auf 5 % eingestellt		
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	17	14	22	17	14	16	17	18	18
<b>pH</b>	7.8	7.5	7.6	7.6	6.8	7.4	7.2	7.5	7.5
<b>Eh [mV]</b>	-210	-100	-180	40	50	-50	0	-30	50
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.9	1.9	1.7	1.9	2.0	1.6	2.0	1.9	2.2
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	3.1	2.9	2.9	3.0	2.7	2.8	3.0	3.0	3.3
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	8.2	6.4	5.4	7.7	9.9	11	13	8.8	10
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	38	35	32	34	32	26	29	32	29

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A18: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1) bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten (TS)**

	2.5 %			5 %			10 %		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	77 ± 3	52 ± 13	20 ± 2	59 ± 1	34 ± 2	16 ± 2	42 ± 2	24 ± 1	16 ± 0
<b>NER [%]</b>	23 ± 4	40 ± 9	66 ± 2	38 ± 15	58 ± 1	76 ± 1	48 ± 4	62 ± 6	64 ± 2
<b>Bilanz [%]</b>	<b>100</b>	<b>92</b>	<b>86</b>	<b>97</b>	<b>92</b>	<b>92</b>	<b>90</b>	<b>86</b>	<b>80</b>

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A19: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1) bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten (TS)**

	2.5 % TS			5 % TS			10 % TS		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	78 ± 7	67 ± 0	32 ± 3	66 ± 4	47 ± 4	27 ± 1	38 ± 0	28 ± 2	25 ± 1
<b>NER [%]</b>	22 ± 2	39 ± 1	63 ± 3	33 ± 0	54 ± 0	59 ± 6	50 ± 4	62 ± 5	62 ± 4
<b>Bilanz [%]</b>	<b>100</b>	<b>106</b>	<b>95</b>	<b>99</b>	<b>101</b>	<b>86</b>	<b>88</b>	<b>90</b>	<b>87</b>

TS: Trockensubstanz; eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A20: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Rindergülle bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten**

Parameter	2.5 % TS			5 % TS			10 % TS		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>TS [%]</b>	auf 2.5 % eingestellt			auf 5 % eingestellt			auf 10 % eingestellt		
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	10	10	10	18	20	20	42	36.0	48
<b>pH</b>	7.2	7.3	6.8	6.8	6.7	6.5	6.4	6.1	6.1
<b>Eh [mV]</b>	30	-40	80	70	90	-20	140	130	50
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	0.3	0.3	0.5	0.9	0.7	0.5	1.3	1.4	1.5
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	0.9	0.8	0.8	1.6	1.5	1.5	3.6	3.4	3.8
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.3	0.4	0.6	0.6	0.5	0.3	0.4	0.4	0.4
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.2	0.8	1.2	2.8	1.8	1.8	7.4	7.1	11
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	16	15	16	32	30	32	68	81	65

TS: Trockensubstanz; eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A21: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol in Schweinegülle bei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten**

Parameter	2.5 %			5 %			10 %		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>TS [%]</b>	auf 2.5 % eingestellt			auf 5 % eingestellt			auf 10 % eingestellt		
<b>TOC [g kg<sup>-1</sup>]</b>	8	9	9	17	18	18	39	44	36
<b>pH</b>	7.9	7.6	6.7	7.2	7.5	7.5	7.8	7.7	7.6
<b>Eh [mV]</b>	70	-10	0	0	-30	50	-230	-210	-30
<b>O<sub>2</sub> [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>NH<sub>4</sub>-N [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.6	1.5	1.6	2.0	1.9	2.2	5.5	5.9	5.4
<b>N<sub>total</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	1.1	1.0	1.0	3.0	3.0	3.3	3.7	3.6	3.3
<b>NH<sub>4</sub>-N/ N<sub>total</sub></b>	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6
<b>BSB<sub>5</sub> [g kg<sup>-1</sup>]</b>	5.1	5.7	4.4	13	8.8	10	12	11	13
<b>CSB [g kg<sup>-1</sup>]</b>	15	15	16	29	32	29	59	57	52

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle

**Tab. A22: Stabilität von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in unterschiedlichen Rindergüllematri-  
zes**

	RG-1			RG-2			RG-3		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	42 ± 2	24 ± 1	16 ± 0	39 ± 1	35 ± 3	8 ± 4	42 ± 2	22 ± 1	15 ± 0
<b>NER [%]</b>	48 ± 4	62 ± 6	64 ± 2	48 ± 10	54 ± 8	76 ± 3	65 ± 1	74 ± 6	94 ± 11
<b>Bilanz [%]</b>	<b>90</b>	<b>86</b>	<b>80</b>	<b>87</b>	<b>89</b>	<b>84</b>	<b>107</b>	<b>96</b>	<b>109</b>

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; RG-1: 5jährige Milchkuh aus Versuchsstall; RG-2: 8 Monate altes Jungrind aus Versuchsstall; RG-3: 5jährige Milchkuh aus Milchviehbetrieb

**Tab. A23: Matrixcharakterisierungstests mit unmarkiertem Sulfamethoxazol nach 7-tägiger Inkubationszeit in verschiedene Rindergüllematrizes**

Parameter	RG-1	RG-2	RG-3
TS [%]	auf 10 % eingestellt		
TOC [g kg <sup>-1</sup> ]	36	43	43
pH	6.1	7.9	7.5
Eh [mV]	130	-120	-170
O <sub>2</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ]	< 0.1	< 0.1	< 0.1
NH <sub>4</sub> -N [g kg <sup>-1</sup> ]	1.4	3.4	4.1
N <sub>total</sub> [g kg <sup>-1</sup> ]	3.4	5.0	6.5
NH <sub>4</sub> -N/ N <sub>total</sub>	0.4	0.7	0.6
BSB <sub>5</sub> [g kg <sup>-1</sup> ]	7.1	3.8	6.0
CSB [g kg <sup>-1</sup> ]	81	52	68

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; RG-1: 5jährige Milchkuh aus Versuchsstall; RG-2: 8 Monate altes Jungrind aus Versuchsstall; RG-3: 5jährige Milchkuh aus Milchviehbetrieb

**Tab. A24: Stabilität von <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol in unterschiedlichen Schweinegülle-matrizes (SG)**

	SG-1			SG-2			SG-3		
	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30	Tag 3	Tag 7	Tag 30
MIN [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
ER [%]	66 ± 4	47 ± 4	27 ± 1	64 ± 5	43 ± 4	25 ± 3	68 ± 4	46 ± 1	18 ± 1
NER [%]	33 ± 0	54 ± 0	59 ± 6	40 ± 4	50 ± 1	77 ± 1	36 ± 5	52 ± 0	82 ± 4
Bilanz [%]	99	101	86	104	93	102	104	98	100

eingesetzt: 560 µg Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; SG-1: Mastschweine aus Versuchsstall; SG-2: Mastschweine aus Versuchsstall, Fütterungsversuch mit erhöhtem Weizenanteil; SG-3: Mastschweine aus Mastbetrieb, Fütterung mit Kartoffelabfällen

**Tab. A25: Stabilität von <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle (RG-1)**

	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
MIN [%]	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
ER [%]	82 ± 7	54 ± 1	36 ± 3	23 ± 1	10 ± 2	11 ± 4	5 ± 1
NER [%]	15 ± 1	34 ± 1	53 ± 4	65 ± 1	81 ± 8	64 ± 1	72 ± 13
Bilanz [%]	97	88	89	88	91	75	77

eingesetzt: 1380 µg Acetyl-Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar



**Tab. A27: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in Schweinegülle (SG-1)**

	Tage nach Applikation						
	0	3	7	30	72	100	177
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.1	0.1	0.1
<b>ER [%]</b>	83 ± 4	61 ± 0	49 ± 11	26 ± 1	30 ± 1	21 ± 6	18 ± 7
<b>NER [%]</b>	12 ± 3	39 ± 6	40 ± 6	52 ± 6	75 ± 2	69 ± 11	81 ± 9
<b>Bilanz [%]</b>	<b>95</b>	<b>100</b>	<b>89</b>	<b>78</b>	<b>105</b>	<b>90</b>	<b>99</b>

eingesetzt: 1380 µg Acetyl-Sulfamethoxazol kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A28: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Rindergülle (RG-1)**

	Tage nach Applikation					
	0	3	7	30	72	100
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	70 ± 2	59 ± 6	54 ± 1	43 ± 1	24 ± 3	20 ± 2
<b>NER [%]</b>	29 ± 1	37 ± 8	41 ± 4	47 ± 1	67 ± 16	66 ± 12
<b>Bilanz [%]</b>	<b>99</b>	<b>96</b>	<b>95</b>	<b>90</b>	<b>91</b>	<b>86</b>

eingesetzt: 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A29: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin (SDZ) in Rindergülle (RG-1)**

	<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	Tage nach Applikation					
		0	3	7	30	72	100
<b>SDZ [%]</b>	0.41	n.b.	33 ± 0	37 ± 3	25 ± 0	13 ± 1	11 ± 1
<b>Σ MET [%]</b>	---	n.b.	28 ± 5	18 ± 4	18 ± 1	11 ± 1	9 ± 1

Laufmittel: Chloroform/n-Butanol (8:1); eingesetzt: 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle; n.b.: nicht bestimmbar; MET: Metaboliten

**Tab. A30: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle (SG-1)**

	Tage nach Applikation					
	0	3	7	30	72	100
<b>MIN [%]</b>	n.b.	< 0.1*	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<b>ER [%]</b>	72 ± 4	70 ± 1	67 ± 1	66 ± 2	60 ± 1	59 ± 2
<b>NER [%]</b>	19 ± 6	14 ± 3	23 ± 1	22 ± 2	28 ± 9	25 ± 6
<b>Bilanz [%]</b>	<b>91</b>	<b>84</b>	<b>90</b>	<b>88</b>	<b>88</b>	<b>84</b>

eingesetzt: 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle; \* bei Doppelbestimmung erster Ansatz < 0.1 %; 2. Ansatz 0.2 %; n.b.: nicht bestimmbar

**Tab. A31: Relative Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten des Stabilitätstests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin (SDZ) in Schweinegülle (SG-1)**

	<b>R<sub>r</sub>-Wert</b>	<b>Tage nach Applikation</b>					
		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>100</b>
<b>SDZ [%]</b>	0.41	64 ± 4	63 ± 1	62 ± 2	56 ± 4	49 ± 1	46 ± 2
<b>Σ MET [%]</b>	---	7 ± 0	7 ± 3	6 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	13 ± 0

Laufmittel: Chloroform/n-Butanol (8:1); eingesetzt: 220 µg Sulfadiazin kg<sup>-1</sup> Gülle; \* bei Doppelbestimmung erster Ansatz < 0.1 %; 2. Ansatz 0.2 %; MET: Metaboliten

**Tab. A32: Bilanz der Nachextraktion der 100-Tage-Proben von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin mit salzsaurem Methanol (MeOH/HCl)**

	<b>Rindergülle</b>		<b>Schweinegülle</b>	
	<b>A-SMZ</b>	<b>SDZ</b>	<b>A-SMZ</b>	<b>SDZ</b>
<b>MIN [%]</b>	< 0.1	< 0.1	0.1	< 0.1
<b>ER<sub>EtAc</sub> [%]</b>	11 ± 4	20 ± 2	21 ± 6	59 ± 2
<b>ER<sub>MeOH/HCl</sub> [%]</b>	9 ± 1	12 ± 3	28 ± 5	16 ± 1
<b>NER [%]</b>	72 ± 14	62 ± 4	32 ± 6	14 ± 3
<b>Bilanz [%]</b>	<b>93</b>	<b>94</b>	<b>80</b>	<b>88</b>

EtAc: Ethylacetat-Extraktion